

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**“EFECTO DE SISTEMAS DE LABRANZA EN LA POBLACIÓN DE  
LOMBRICES Y EN LA ESTRUCTURA DEL SUELO”**

**TESIS**

**(Idónea Comunicación de Resultados)**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias Agropecuarias**

P R E S E N T A

**MIGUEL ANGEL DE JESUS ROSAS MEDINA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. FERNANDO DE LEÓN GONZÁLEZ (Director)**

**DR. ANTONIO FLORES MACÍAS (Asesor)**

**DR. FIDEL PAYÁN ZELAYA (Asesor)**

México, D. F. 17 de Septiembre de 2009

La presente tesis titulada: “**Efecto de sistemas de labranza en la población de lombrices y en la estructura del suelo**”, realizada por el alumno Miguel Ángel de Jesús Rosas Medina, bajo la dirección del comité tutorial indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de

## **MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

### COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR	Dr. FERNANDO DE LEÓN GONZÁLEZ	_____
ASESOR	Dr. ANTONIO FLORES MACÍAS	_____
ASESOR	Dr. FIDEL PAYÁN ZELAYA	_____

México D.F. Septiembre de 2009

**“la idea fundamental del diseño o propósito (divino), mira fijamente al biólogo, no importa donde ponga éste los ojos la probabilidad de que un acontecimiento como el origen de las moléculas de ADN haya tenido lugar por pura casualidad es sencillamente demasiado minúscula para considerarla con seriedad”**

**Ernst Boris Chain (1906 -1979) científico alemán,  
Premio Nobel de medicina 1945 junto con Howard W. Florey y Alexander Fleming por  
descubrir la penicilina**

# **Agradecimientos**

**Le agradezco a Dios por confirmarme a través de la ciencia su existencia y más aun por dejarme verle en mi vida día a día.**

**Le agradezco a mis padres: Miguel y Yolanda por su apoyo infinito y su amor incomparable, a mis hermanos David y Celeste que los quiero con todo mi corazón, a familiares y amigos que siempre me apoyan, a todos: “Les dedico con mucho cariño esta tesis.”**

## *GRACIAS*

**A mi asesor Fernando por sus consejos y enseñanzas de maestría y de vida, su paciencia y la gran amistad que tenemos.**

**A mis asesores Antonio y Fidel por sus palabras de apoyo, sus observaciones y el tiempo que me dedicaron.**

**An Walter für all seine Hilfe und dass er mich in Bielefeld empfangen und integriert hat. Ebenso an all die Personen aus dem Labor, die mir geholfen haben, und die die Kraft aufbrachten mich zu verstehen. (besonders an Fabian, Michael und Mina)**

**An Christina Hendrys für all die Unterstützung, die du mir vom ersten Tag an bis zum letzten meines Forschungsaufenthaltes gegeben hast, für all deine Liebe und dafür, die inspirierende Muse meines Deutschlandsaufenthalts gewesen zu sein.**

**Devora mil gracias por tu disponibilidad para enseñarme todo lo que se del ADN, por los inigualables tecitos “y que viva España”**

**Gracias a los charolastras Mario Javier y Gina por hacer mi tiempo tan ameno en las horas de laboratorio y durante mi maestría.**

**A TODOS MIS AMIGOS**

---

# INDICE

---

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 Tratamientos mecanizados	3
2.1.1 Rastra	4
2.1.2 Arado	5
2.1.3 Multiarado ('ripper')	6
2.1.4. Multiarado Cruzado	7
2.1.5. Impacto de los sistemas de labranza	7
2.2 Lombrices del suelo	8
2.3 Humedad del suelo	11
2.4 Porosidad del suelo	12
2.5 Compactación y resistencia mecánica	14
2.6 Materia orgánica	15
2.7 Análisis de ADN de lombrices	18
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
3.1 Objetivo General	21
3.2 Objetivos Específicos	21
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>21</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
5.1 Zona de estudio	22

5.2	Diseño del experimento	22
5.3	Fecha de muestreo	23
5.4	Determinación de humedad	25
5.5	Resistencia mecánica	25
5.6	Materia orgánica en el suelo (MOS)	26
5.7	Estimación del rendimiento del rastrojo	27
5.8	Número de orificios de galerías en muestras de suelo	28
5.9	Colecta de lombrices de tierra	28
5.10	Análisis molecular	28
5.11	Análisis estadístico	31
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
6.1	Análisis de textura del suelo	33
6.2	Humedad del suelo	33
6.3	Resistencia mecánica del suelo (MPa)	33
6.4	Materia orgánica	37
6.5	Población, biomasa y longitud de lombrices	37
6.6	Orificios de galerías producidas por las lombrices	44
6.7	Asociación entre variables	45
6.8	Comparación filogenética de las lombrices	46
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>56</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>63</b>

## RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en 2007 y 2008 y se centró en la población de lombrices que habitan las parcelas cultivadas con maíz en un suelo arcilloso típico de la región de Toluca-Atlacomulco. Mediante comparación de la apariencia externa de las lombrices y por el análisis de biología molecular, se determinó que la especie que habita esos suelos es *Lumbricus terrestris*. Se hicieron tres muestreos de suelo: 1 y 2 (en abril y noviembre de 2007, respectivamente) y 3 (en Enero de 2008). El primer muestreo fue inmediatamente posterior a la aplicación de cuatro tratamientos de labranza, ordenados en forma creciente en cuanto a la fuerza aplicada al suelo: (1) Rastra, dos pasos cruzados; (2) Arado de Disco + Rastra, dos pasos cruzados; (3) Multiarado + Rastra, dos pasos cruzados y (4) Multiarado Cruzado + Rastra, un paso. Estos tratamientos se han aplicado continuamente y en las mismas parcelas durante un período de 4 años. El muestreo 2 se realizó cuando la mazorca del maíz estaba en madurez fisiológica y el muestreo 3 se realizó después de la cosecha mecánica del cultivo. Se planteó como hipótesis general que a mayor intensidad de fuerza mecánica, menor sería la población de lombrices. Cada tratamiento presentó tres repeticiones. La superficie de las parcelas fue de 200 m<sup>2</sup> (20 x 10 m).

Se tomaron muestras de suelo para determinar humedad (método gravimétrico) y materia orgánica (separación de fracción ligera, intermedia y pesada, mediante dispersión en la sustancia Ludox). Los días de muestreo se midió la resistencia mecánica del suelo con un penetrómetro portátil. Se contó el número de lombrices presentes en un volumen de suelo de 1200 cm<sup>3</sup>, distinguiendo entre organismos juveniles (< 5.0 cm de largo) y adultos (> 5.0 cm de largo). Las lombrices fueron colocadas en bolsas de plástico y llevadas a laboratorio en donde se pesaron para determinar su biomasa. Los datos fueron tabulados y analizados con el programa SAS usando el modelo General Lineal. Cuando se encontraron diferencias estadísticas, se procedió a hacer grupos homogéneos de promedios mediante la prueba estadística de Tukey, utilizando el mismo programa. También se realizaron comparaciones estadísticas de las variables entre fechas de muestreo.

Los resultados indicaron cambios importantes en humedad del suelo, y resistencia mecánica del suelo en los tres muestreos. Estos resultados se comportaron conforme a lo esperado. Cuando la humedad del suelo fue baja (13.55 %) se tuvo una resistencia alta (3.88 MPa) y a la inversa, cuando fue alta la humedad (40.49 %) la resistencia fue baja (2.34 MPa).

El contenido de materia orgánica se ordenó de la siguiente manera: fracción pesada>fracción intermedia>fracción ligera. No se presentaron diferencias entre tratamientos y entre fechas de los muestreos. No hubo diferencias significativas en el rendimiento estimado de rastrojo, el cual varió entre 2 y 5 ton ha<sup>-1</sup>.

La población de lombrices fue mayor en el segundo muestreo, cuando el suelo presentaba mayor humedad y cuando el sistema de raíces se encontraba todavía vivo. Se encontró una variación de 6-23 individuos en 1200 cm<sup>3</sup> de suelo (0-15 cm de profundidad). Los tratamientos de labranza aplicados al suelo no tuvieron un efecto significativo en la población de lombrices, con lo cual no se confirmó la hipótesis de trabajo. Esto significa que la intensidad de las operaciones de labranza en el sistema de cultivo de maíz, realizadas en el mes de abril, no afectó la población de lombrices que habitó en el perfil arable durante la permanencia del cultivo en el campo. Es posible que debido al desecamiento del suelo y las bajas temperaturas, la población de lombrices baje significativamente en el invierno y en el inicio de la primavera, de tal modo que sea irrelevante para la dinámica de poblaciones de lombrices la intensidad con que se aplican las labores de preparación de la cama de siembra. Otra posibilidad es que una parte de la población de lombrices que creció en el ciclo anterior vaya a estratos más profundos del suelo (> 50 cm) a hacer sus galerías de tal modo que las operaciones de labranza no afecta su hábitat. Los resultados también indicaron que el efecto acumulado de las cuatro formas de preparar el suelo para la siembra no tuvo un efecto en la población y biomasa de las lombrices.

Un hallazgo del trabajo fue que el número de galerías de las lombrices se mantuvo constante en los tres muestreos (23, 26, y 28 para los muestreos 1, 2 y 3 respectivamente). Es decir, a pesar de que las poblaciones de lombrices fue diferente en los tres muestreos, y que la intensidad de labores de labranza también fueron diferentes, el número de orificios de galerías contadas en el suelo fue el mismo. Esto indica que para el suelo arcilloso bajo estudio, las galerías formadas por las lombrices no desaparecen estacionalmente por cambios en la población de organismos ni por los efectos acumulados de las presiones, cortes y fisuración provocada por los distintos métodos de preparación del suelo y por la evolución estructural que estacionalmente experimenta el perfil arable. Se considera que este resultado



está relacionado con la textura arcillosa del suelo, pues las galerías se mantienen estables en los procesos de secado-humedecimiento del suelo.

El presente trabajo es una primera contribución al estudio de las poblaciones de macroorganismos en suelos ricos en MO y con alta humedad en la época de lluvias que prevalecen en la región de Toluca-Atlacomulco. Otros estudios deberán completar en un futuro nueva información de tal forma que el conocimiento de este grupo de organismos ayude a la práctica de una agricultura sustentable en la región.

## ABSTRACT

This work was developed in 2007 and 2008 and focused on the population of earthworms that live in cultivated fields of a clayey typical soil of Toluca-Atlacomulco region. By comparing the external appearance of the earthworms and by the analysis of molecular biology, it was determined that the species inhabiting this soil is *Lumbricus terrestris*. There were three sampling dates: in April and November 2007, respectively, and in January 2008. The first sampling was immediately after application of four tillage treatments, arranged in an increasing order of the force applied to the soil: (1) Disk harrow, (2) Plow disk + Disc Harrow, (3) pseudo-Subsoiling + Disk Harrow and (4) Two passes of pseudo-Subsoiling + Disk Harrow. These treatments were applied continuously and on the same plots for a period of 4 years before 2008. The second sampling date occurred when the ear of corn was at physiological maturity and the third sampling date corresponded to the mechanical harvest of the crop. It was raised as a general hypothesis that with increasing intensity of mechanical force to the soil it would diminish the population of earthworms. Each treatment had three replicates. The area of plots was 200 m<sup>2</sup> (20 x 10 m). Soil samples were taken to determine soil water content (gravimetric method) and organic matter (light, intermediate and heavy fractions separated by dispersion by Ludox). The day of each sampling date was measured the soil strength using a portable penetrometer. We counted the number of earthworms present in a soil volume of 1200 cm<sup>3</sup>, distinguishing between immature (< 5.1 cm) and adult (> 5.3 cm long) organisms. The earthworms were placed in plastic bags and carried to the laboratory where they were weighed to determine their biomass. Data were tabulated and analyzed using the SAS program (General Linear Model). When statistical differences were found, we proceeded to make homogeneous groups of means by Tukey test, using the same program cited above. Also, statistical comparisons among sampling dates were performed.

The results indicated significant changes in soil moisture, and mechanical strength of soil in the three sampling dates. Results were according to the expectations. When soil water content was low (13.55%) it had a high resistance (3.88 MPa) and inversely, when the water content was high (40.49%), resistance was low (2.34 MPa). Organic matter masses ordered as follows:

heavy > intermediate > light fraction. There were no differences among treatments and among sampling dates for the three types of organic matter.

The population of earthworms was higher in the second sampling date, when the soil had higher water content and when the root system was still alive. We found a variation of 6-23 individuals in 1200 cm<sup>3</sup> soil (0-15 cm depth). The tillage treatments had no significant effect on the population of earthworms, which invalid the hypothesis at the beginning of the study. That means that the intensity of tillage operations in the corn cropping system did not affect the population of earthworms that lived in the arable profile. It is possible that due to soil drying and low temperatures, the population of earthworms significantly decreased in the winter and early spring. Another possibility is that a portion of the population of earthworms that grew in the previous crop cycle will be in deeper soil layers (> 50 cm) in such a form that individuals were not affected by tillage operations. The results also indicate that the cumulative effect of the four ways to prepare the soil for seeding had no effect on the population and biomass of earthworms.

A finding of this study was that the number of galleries of the worms remained constant in all sampling dates (23, 26 and 28 for samples 1, 2 and 3 dates, respectively). That means that although the population of earthworms was different in the three sampling dates, and the intensity of tillage work were different, the number of holes of galleries in the soil was the same. This suggests that the galleries formed by the earthworms in this clayey soil do not disappear by seasonal climate changes or by the cumulative effects of pressure, cuts and cracking caused by the different methods of soil preparation. It is considered that this result is related to the clayey soil behavior, because the galleries are stable during the wetting-drying cycles of soil.

This work is a first contribution to the study of populations of macro-organisms as earthworms in soils rich in OM and high water content of soils prevailing in the region of Toluca-Atlacomulco. Other studies must complete in the future new information about the role of earthworms in soil fertility in order to find sustainable agricultural practices in the region.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de labranza se utilizan en la agricultura para incrementar la producción. Sin embargo con el abuso en estas prácticas los suelos se vuelven susceptibles a procesos de degradación que a futuro comprometen la sustentabilidad de los recursos productivos.

Los sistemas de labranza mecánica son eficientes en áreas de cultivo donde existe una alta compactación, en la cual la infiltración del agua de lluvia es limitada por la poca cantidad de espacios porosos y la presencia de horizontes compactos de baja permeabilidad en el subsuelo, dando como resultado una baja humedad y cantidades reducidas de materia orgánica así como una limitada población de lombrices. En estas situaciones una labranza profunda de todo el campo con implementos mecánicos permite romper el horizonte compacto, mejorando la permeabilidad del subsuelo y la infiltración de más agua de lluvia. Al mejorar las condiciones del suelo mejora la disponibilidad de materia orgánica, aumenta la población de lombrices y éstas elevan la porosidad del perfil arable del suelo y con ello la productividad de los cultivos también mejora. Sin embargo, los efectos positivos de la labranza profunda pueden durar sólo dos o tres años; después es necesario intensificar más la mecanización y por consecuencia empeoran las condiciones del suelo, al elevarse el nivel de compactación, y disminuir la humedad, alterando el hábitat de las lombrices, reduciendo así el número de organismos en la población y con ello las galerías que realizan. Al no haber galerías aumenta la compactación y comienza un ciclo de deterioro de las tierras de cultivo.

En el presente estudio se compara el efecto de cuatro diferentes tratamientos mecanizados sobre la población de lombrices, las galerías que generan, la materia orgánica disponible presente así como los niveles de humedad y la compactación del suelo en parcelas agrícolas del Campo Experimental en la Universidad Autónoma del Estado de México (Campus Cerrillo).

El estudio de las relaciones arriba señaladas es de suma importancia puesto que al evaluar el impacto de las diferentes prácticas de labranza en el desarrollo de la población de lombrices y en la estructura del suelos se podrán establecer recomendaciones en cuanto a la intensidad y frecuencia en las labores de labranza para suelos arcillosos del Valle de Toluca-

Atacomulco, tomando en cuenta los criterios de calidad de la estructura del suelo y conservación de las lombrices y de su efecto benéfico a través de la construcción de galerías.

El presente proyecto se propuso generar información con aplicaciones prácticas para el uso del suelo estudiado, dirigido hacia una agricultura sustentable.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Tratamientos mecanizados

La mecanización de los cultivos conlleva ventajas en cuanto a la producción, pero también produce un impacto ecológico en el ecosistema. La labranza en los sistemas de cultivo producen una serie de beneficios para la producción, ya que descompacta el suelo, incrementa la aeración, la porosidad, el índice de infiltración, mejora el drenaje, la distribución de la humedad, produce un relieve (el cual crea resistencia a la escorrentía superficial) y finalmente desprende del suelo a los residuos de raíces-tallos y descompacta el terreno, todo ello para favorecer el crecimiento radicular y preparar una cama de siembra para el desarrollo de los cultivos que se sembrarán (Azooz y Arshad, 1995). Los arados son instrumentos que se usan para remover las capas de suelo compactadas (Cassel, 1979). El efecto de tal práctica es la descompactación del suelo en los primeros 20-25 cm justo en el horizonte donde habitan las lombrices y crecen las raíces. A largo plazo, el barbecho convencional tiene como consecuencia la formación de un “piso de arado”, el cual es una capa muy compactada en la base de la capa arable. Este piso de arado es un obstáculo para la circulación de agua y aire, y para el crecimiento de las raíces (De León y Pérez Jerónimo, 1998).

En la literatura se reconocen dos tipos de labranza: primaria, cuando interviene una aradura (disco, vertedera o reja), y secundaria, cuando intervienen implementos de trabajo más superficial después de la labranza primaria o en lugar de ella (De León y Pérez Jerónimo, 1998).

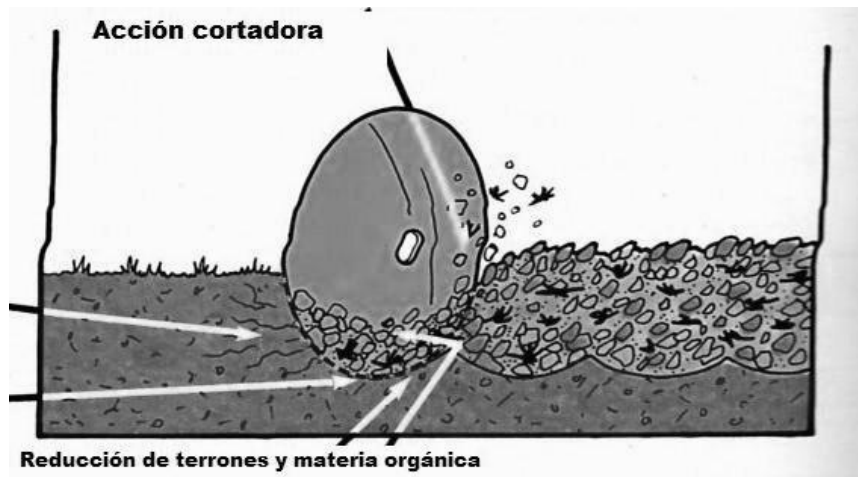
La utilización de la mecanización de la labranza implica daños colaterales con efectos visibles a futuro, en un principio trae beneficios, pero si se prolonga o intensifica el uso de estos implementos terminan por deteriorar la condición física del suelo de cultivo, puesto que se afectan algunas de sus propiedades físicas como el nivel de compactación (Wander *et al.*, 1998), también es afectada la porosidad del suelo, en la cantidad y los tamaños de los poros así como su distribución (Hermawan y Cameron, 1993; Azooz y Arshad, 1995); también afecta la capacidad de retención de agua en el suelo (Trojan y Linden, 1998), y contenido de humedad (Azooz y Arshad, 1995), sin embargo una de las principales características de la labranza mecánica en general es el hecho que con esta actividad se modifica la distribución

de la materia orgánica en el perfil del suelo, siendo el principal objetivo el disponer de la materia orgánica en las primeras capas de suelo, lo más cerca posible de la superficie para que los nutrientes que se producen durante su mineralización estén a disposición de las plantas de cultivo (Duxbury *et al.*,1989).

### **2.1.1 Rastra**

La rastra consiste de implementos de labranza básica compuestos de hojas de disco independientes de libre giro, inclinadas en un ángulo respecto al suelo. Este instrumento se usa en áreas que presentan suelos compactos, en donde el principal objetivo es el corte de bloques grandes de suelo (20 cm) para reducir su tamaño, se usa sólo como un instrumento de labranza de corte de elementos estructurales en superficie como son terrones y bloques, y residuos orgánicos del cultivo anterior (Manichon, 1994) cuando no se desea una cobertura de residuos completa. La práctica más común de la rastra es para suelos con un drenaje deficiente, en donde se realizan camellones en los cuales se preparan las camas de siembra (Hunt, 1986).

Las herramientas de labranza superficiales dejan el suelo con residuos superficiales y un perfil rugoso (siempre y cuando el suelo tenga un contenido de arcilla de medio a alto), los que son muy efectivos para reducir la erosión ocasionada por el aire y el agua, además de reducir el tamaño de los residuos de cosecha que beneficia a futuro a las cantidades de materia orgánica disponibles para los cultivos, sin embargo una limitante de este instrumento es que en su acción no voltea el suelo como el arado, por lo tanto la superficie resulta descompactada pero no la capa que se encuentra abajo de ella.

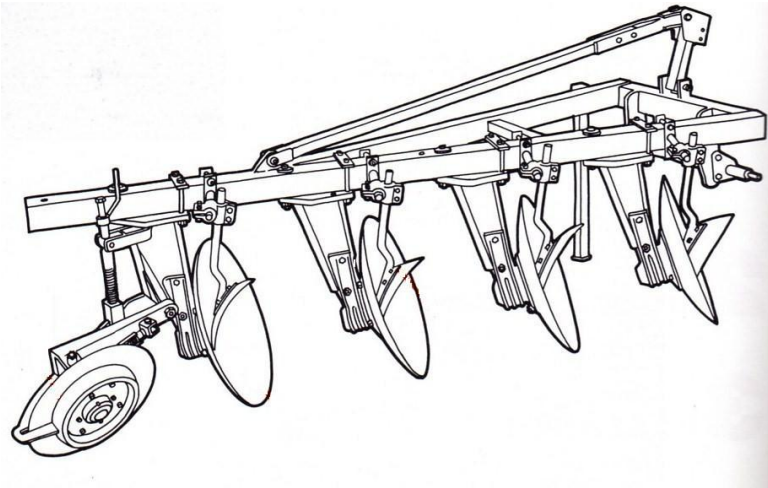


**Figura1 Acción mecánica de la Rastra**

### **2.1.2 Arado**

Los arados de discos verticales tienen hojas de disco montadas en un eje común, estos discos son más grandes que los de la rastra. Su principal función es el corte y el volteo del suelo y de los residuos vegetales (Carter, 1988) Su acción es más profunda (20-25 cm normalmente) que la rastra. Los bordes de las hojas de disco construidos sólidamente descansan en un plano vertical respecto al suelo para rotular las capas del suelo compactadas de 25 a 30 cm de profundidad, estos implementos se utilizan para cortar por completo los bloques de suelo y de residuos de cosecha y para incorporarlos parcialmente, también ayuda con el control de malezas y para la preparación de la cama de siembra. Esta herramienta de labranza mecánica presenta un diseño estándar escalonado para fomentar el paso de raíces, tallos, hojas y otros materiales superficiales a través del implemento. Uno de los objetivos principales del arado es la descompactación en la capa arable del suelo por medio de fisuración por fricción y a su vez realizar la acción de corte y volteo del suelo, con incorporación de residuos de cosecha, lo que da como resultado la creación de más porosidad en el suelo para drenar el agua libre y para permitir el movimiento del aire a través del suelo. Además ocurre la incorporación parcial de residuos por el giro del disco, favoreciendo el aumento de la materia orgánica en el subsuelo, aunque cabe mencionar que hasta cierto punto estos instrumentos también efectúan el asentamiento y la compactación del suelo por las fuerzas aplicadas verticalmente al suelo por el peso del instrumento (Hunt, 1986).

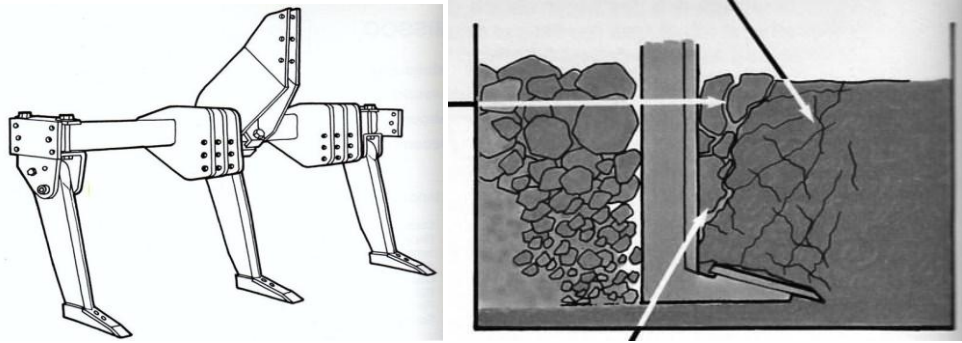




**Figura2 Arado**

### **2.1.3 Multiarado ('ripper)**

El multiarado realiza el corte horizontal y vertical del suelo sin el volteo, con lo que se beneficia el movimiento del agua al mejorar el drenaje y la distribución de la humedad, y del aire aumentando la aireación y la penetración de raíces (Ortíz R., 1995). En general, el multiarado permite aumentar la producción de varios cultivos como la soya y el maíz, trabaja en todo tipo de suelo, en diferentes rangos de humedad. De acuerdo con los constructores de este tipo de implemento, el uso continuo del multiarado aumenta el rendimiento de los cultivos y hace más eficiente el uso de los agroquímicos. Su trabajo en el suelo deja un estado poroso al aumentar el volumen de macroporos en el suelo donde se infiltra un mayor porcentaje de agua de lluvia, aumentando las reservas de humedad para la mayoría del ciclo vegetativo del cultivo, también disminuye el escurrimiento superficial y con su corte horizontal en el suelo permite que este equipo trabaje con niveles de humedad altos. Bajo el principio de corte horizontal, con este tipo de arado se intenta restablecer una parte del equilibrio biológico del suelo, con esta tecnología se logra disminuir la compactación natural del suelo o la causada por el cultivo constante (Caliman *et al.*, 1990).



**Figura3 Acción mecánica del Multiarado (descompactador sin volteo)**

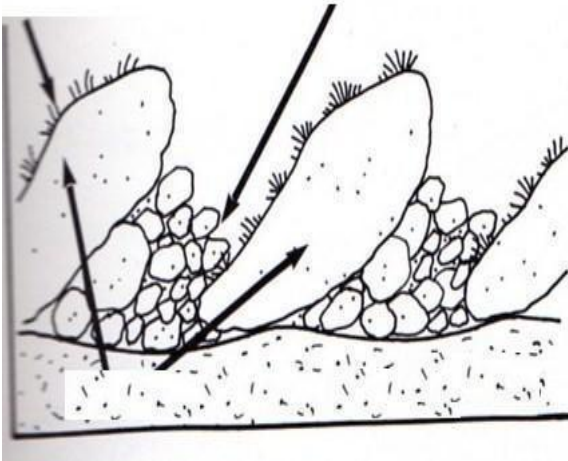
#### **2.1.4 Multiarado cruzado**

Esta acción se refiere a la descompactación vertical a una profundidad entre 30-40 cm, sin voltear el suelo lo cual significa una necesidad de tracción menor que el arado de disco o de reja. El multiarado puede aplicarse en un solo sentido o cruzado. Sin embargo se corre el riesgo de mayor compactación con el uso de este tipo de labranza puesto que su acción es mas intensiva (Fuentes *et al.*, 2004).

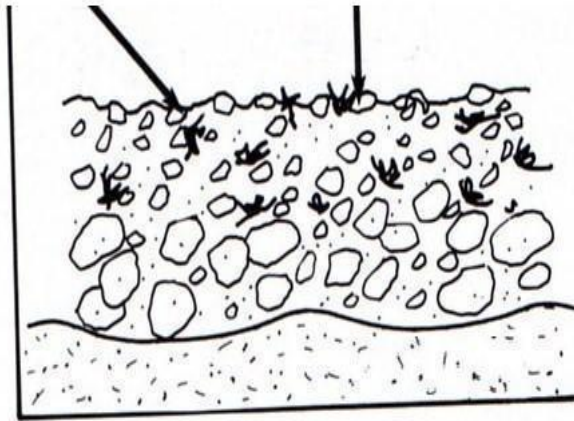
#### **2.1.5 Impacto de los sistemas de labranza**

La aplicación de los sistemas de labranza en los campos de cultivo produce un impacto en la estructura del suelo, lo cual altera el hábitat de los diferentes organismos. Los suelos agrícolas que se someten a diferentes tratamientos mecánicos tienen diferentes efectos en las poblaciones de lombrices así como en algunas características de la estructura del suelo, al afectar a las lombrices, afectan una de las principales contribuciones de estos organismos a la porosidad y estructura del suelo. Shuster *et al.*, (2002) realizaron estudios en poblaciones de lombrices para establecer el impacto que tienen los sistemas de labranza mecanizados en estos organismos y encontraron que la población de organismos estudiados en el suelo fueron afectados significativamente por uno o más tratamientos.

Corte de terrotes por bloques grandes y pequeños



Terrones triturados e incorporación de materia orgánica



**Figura 4 Estado estructural resultado de la acción del (a) arado y (b) de la rastra**

## 2.2 Lombrices del suelo

La labranza con implementos de corte puede afectar indirectamente a las lombrices puesto que generan una alta variabilidad en la temperatura y humedad así como la materia orgánica disponible en el suelo; bajo estas condiciones las lombrices pueden experimentar severas limitaciones de alimento lo que se refleja directamente en la densidad de la población y la biomasa (Compagnoni y Putzolu, 1995).

Las lombrices tienen una gran influencia en los procesos del suelo. Las poblaciones de lombrices son valiosas para la fertilidad del suelo, puesto que son consumidoras de materia orgánica y de suelo, con lo cual permiten la aireación a través de la construcción de sus galerías que sirven para dar mayor porosidad. Un suelo con una alta población de lombrices es un suelo que tiene mejores condiciones para mantener sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Por lo tanto las lombrices son usadas como indicadores biológicos de la sustentabilidad del suelo para su utilización en los cultivos (Clive, 2004).

En la agricultura las lombrices tienen una influencia en la producción agrícola, en la conservación de suelos y en el medio ambiente; constituyen la macro fauna del suelo con mayor relevancia para la fertilidad y la calidad de este recurso (Clive, 2004).

Las lombrices habitan generalmente el horizonte A (antrópico), donde realizan la mayoría de sus actividades, esto es hasta una profundidad de 30 cm. La determinación de su hábitat es de suma importancia para la toma de muestras en campo y para estimar el tamaño de la

muestra de suelo que se necesita para la captura de organismos. En este horizonte es donde las lombrices tienen una mayor influencia en la estructura del suelo (Shuster, 2002).

Las poblaciones de lombrices tienen una relación directa con las propiedades de suelo. El efecto más notable que realizan las lombrices en la estructura del suelo son los poros que dejan al desplazarse de un lugar a otro y al formar sus madrigueras, por lo cual un estudio de galerías y porosidad permite una estimación del grado de impacto que tienen las lombrices bajo los diferentes sistemas de labranza (Amador, *et al.*, 2003).

Los sistemas de labranza impactan a la población de lombrices así como a la relación de éstas con las propiedades del suelo. La diversidad de especies así como el número de organismos están relacionados con las variables físicas y químicas del suelo (Joschko, *et al.*, 2005), por lo que al estudiar algunos factores del suelo se pueden establecer los niveles de influencia de los tratamientos en la población de lombrices. La forma en que se pueden conocer los efectos que producen los sistemas de labranzas en el suelo es determinando la resistencia mecánica y estudiando la población de lombrices y sus efectos en la estructura del suelo (Katsvairo *et al.*, 2002).

Existen diferentes ejemplos acerca de la interacción de las lombrices con los sistemas de labranza. Las labores de labranza fueron diseñadas para favorecer el crecimiento de los cultivos y el efecto de dichas labores sobre la población de lombrices está mediada por cambios en hábitat de las lombrices (Chan, 2001). Se ha reportado en la literatura que en campos de maíz donde se aplicaron tratamientos convencionales de arado, la población de lombrices fue baja y con mayor frecuencia de juveniles, por lo que se considera que existe un impacto negativo de los tratamientos en la población de lombrices (Reeleder, *et al.* 2006).

La información acerca de la distribución espacial de las lombrices es de suma importancia para entender los efectos de los sistemas de labranza en las poblaciones lo que a su vez influye en la estructura del suelo. En el noreste de Alemania se realizó un estudio para determinar si la diversidad de lombrices estaba correlacionada con las propiedades físicas del suelo, en suelos que fueron usados para cultivo en 1996, 1997 y 1998 (Joschko *et al.*, 2005). Fueron muestreados 50 sitios en los cuales se determinó la biomasa y la composición de especies; los resultados mostraron que la abundancia y la biomasa total de las lombrices fluctuaron a través de los años estudiados, sin embargo se observó también una migración de sur a norte a través de los años, este patrón fue atribuido al mejoramiento de las propiedades

del suelo óptimo para las lombrices como la disposición de materia orgánica, con lo que se demostró la relación de la población de lombrices con algunos factores del suelo (Joschko, *et al.*, 2005). Cabe mencionar que en algunos trabajos se toma en cuenta el trabajo de las lombrices por su relevancia en la infiltración de los nutrimentos por medio del agua; tal es el caso de un estudio en Estados Unidos en donde se analizaron algunos cambios biológicos que se produjeron en los campos con labranza intensiva; el primer efecto que se observó fue la erosión en el suelo por el viento y por la infiltración de agua por precipitación. La hipótesis que se planteó es que las infiltraciones producen cambios en la estructura del suelo y con ello los cambios biológicos; en este estudio Wuest *et al.* (2005) concluyeron (después de tomar como variables a la materia orgánica y al nitrógeno en el suelo y correlacionarlas con la infiltración de los campos), que la infiltración produjo cambios en las concentraciones de nutrimentos y nitrógeno sin embargo estos cambios son considerados muy bajos y poco significativos. Estos estudios ayudan a comprender la función de las lombrices al realizar la infiltración de nutrimentos por medio de las galerías y el aumento de transporte de agua través de ellas. Sin embargo se necesitan hacer más estudios acerca de la relación que mantienen las lombrices y sus galerías sobre los campos con labranza intensificada.

La investigación de lombrices en relación con sistemas de labranza es limitada, además de que la relación entre las lombrices y las propiedades del suelo no ha sido totalmente entendida (Ramasamy, 2005). En México se han realizado diferentes trabajos acerca de las lombrices como es el caso de Huerta *et al.*, (2005) quienes investigaron la diversidad de las especies en diferentes estados y uno de los puntos que se mencionan es que los sistemas de labranza mecanizados pueden afectar de manera directa e indirecta la población de lombrices, dependiendo de la severidad y frecuencia de los disturbios del suelo, ya que la población de lombrices es sensible a dichos cambios. Esta problemática biológica se asocia directamente a los cultivos, puesto que se ha estudiado que en especial las lombrices tropicales tienen poca tolerancia a los cultivos tratados con sistemas de labranza mecánica (Huerta, 2005).

Existe muy poca información en México sobre la ecología de las lombrices en suelos de uso agrícola y menos aún sobre el efecto de las lombrices en la estructura de los suelos. En el área de estudio (Valle de Toluca-Atlacomulco) no existen reportes acerca de los efectos de la labranza en la población de lombrices.

De acuerdo a lo anterior es importante determinar los efectos de los sistemas de labranza en la población de lombrices, puesto que estos organismos son usados como indicadores biológicos de sustentabilidad agrícola (Clive, 2004).

### **2.3 Humedad del suelo**

La humedad del suelo es la cantidad de agua por volumen de suelo en un momento determinado. La humedad del suelo proviene de la lluvia, de aportes subterráneos, o del riego. Una buena estructura permite una adecuada distribución de la humedad en el perfil arable donde crecen las raíces. La humedad es de suma importancia debido a que regula como factor abiótico las condiciones para la biota del suelo y tiene relación o interacción con las plantas y cultivos que dependen del suelo.

En los sistemas mecanizados para que se realice una labranza eficaz es necesario que se efectúe con el contenido óptimo de humedad del suelo. Los suelos que se trabajan demasiado secos no se dañan pero los requerimientos de energía para su labranza con frecuencia son considerablemente mayores que si se trabajan con un contenido de humedad óptimo. Cuando el suelo está húmedo se requiere menos energía para el subsoleo y el volumen de suelo que es removido disminuye, sin embargo las condiciones con demasiada o poca humedad o por la pérdida de humedad del suelo da como resultado la reducción del rendimiento potencial (Hunt, 1986).

En estudios realizados en Costa Rica, se demostró que el contenido de humedad y porosidad ejercen un efecto sobre la producción de palma aceitera (Durán *et al.*, 1993). En este mismo contexto cabe mencionar que la distribución de las lombrices está determinada por las características físicas y químicas del suelo en las cuales destacan la humedad, y la materia orgánica (Huerta *et al.*, 2005). Cuando hay cambios drásticos en la temperatura del hábitat existe una alta mortalidad en la población de lombrices, particularmente en los juveniles (Olchawa *et al.* 2006).

### **2.4 Porosidad del suelo**

La porosidad del suelo es una propiedad particular de la estructura del suelo, y en la cual la textura interviene en la escala del arreglo de las partículas elementales del suelo (Guerif, 1987). Es el sistema de espacios vacíos o poros que están generalmente llenos de aire y por los cuales el agua atraviesa rápidamente, impulsada por la fuerza de la gravedad.

El estudio de la evolución de la estructura de un suelo sometido a acciones mecánicas y climáticas puede abordarse a partir de un seguimiento de las propiedades físicas que lo caracterizan. Entre estas propiedades, la más importante es la porosidad, ya que relaciona el volumen de suelo que exploran las raíces con el volumen disponible para el agua y el aire que requieren en su desarrollo (Guerif, 1987).

El mantenimiento de un suelo arenoso estructurado en una parcela sembrada con cultivos anuales como maíz, girasol o amaranto depende del desarrollo de raíces puesto que estas le otorgan estabilidad al suelo (De León *et al.*, 2006). Los distintos sistemas radiculares exploran diferentes estratos del perfil, permitiendo una colonización del suelo tanto vertical como horizontal. Luego de la cosecha de cada cultivo, las raíces muertas son descompuestas por los microorganismos del suelo (Lorenzatti, 2005). Al crecer las raíces forman macroporos biológicos. Las lombrices contribuyen en este proceso puesto que comen raíces pero sólo en estado de descomposición (García y Solano, 2005). Las raíces del maíz generan una clase determinada de poros, los cuales según su tamaño tendrán funciones de aireación, ingreso del agua al perfil, almacenamiento, o funciones mixtas. Cabe destacar que en la continuidad y estabilidad de la red de poros generadas en un suelo bajo siembra directa puede verse destruida por la acción de una sola labranza, por más ocasional que sea (Lorenzatti, 2005).

Las lombrices contribuyen con la porosidad del suelo por medio de los túneles que crean con la acción de la parte anterior (“cabeza”) de su cuerpo. Los túneles son el hábitat de las lombrices (madrigueras) conformando un sistema de galerías. En estado de hibernación, las lombrices pueden encontrarse en huecos esféricos que permiten el acomodo de su cuerpo enrollado (Compagnoni y Putzolu, 1995). Las madrigueras de las lombrices son estructuras realizadas en una mayor proporción cuando el suelo está húmedo (Clive, 2004). En estos poros biológicos hechos por las lombrices sirven como microcanales hidrológicos, lo cual incrementa la infiltración, además la estructura de los túneles favorece el transporte de agua, nutrimentos y bacterias que benefician la fertilidad (Silver y Defries, 1990). Con ello se

aumenta la reserva de agua y de nutrientes disponibles para las raíces de la vegetación natural y de los cultivos (Compagnoni y Putzolu, 1995).

Esta abundancia de canales hidráulicos está basada en el hábito excavador de las lombrices. Los efectos dependen de sus interacciones con los factores bióticos y abióticos, en diferentes escalas de tiempo y espacio, dando como resultado una regulación física de la estructura del suelo (Kimbal, 1986). Este comportamiento genera la transformación de las propiedades físicas del suelo que eventualmente resulta en cambios en el régimen del agua en el sustrato durante los periodos de lluvia, ya que la distribución horizontal y vertical de galerías afecta la aireación e infiltración del suelo (Samaca, 1999).

La distribución de raíces puede ser afectada por la presencia de los túneles de las lombrices, además de que cuando es temporada de lluvias el agua que cae incrementa la humedad del suelo e influencia las concentraciones, descargas y transporte de químicos por medio de la porosidad proporcionada por los túneles de las lombrices (Schimel, 2001). Existe una larga variedad de estructuras que se desarrollan en la interfase de la matriz del suelo y los túneles de lombrices, en las que se genera la descomposición de materia orgánica lo que produce efectos en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Vitousek *et al.*, 1986). Por último cabe mencionar que la evaluación de la porosidad puede ser medida a través del análisis de imágenes y relacionarla con la población de lombrices en el suelo analizado (VandenBygaart *et al.*, 2000).

## **2.5 Compactación y resistencia mecánica**

La compactación es definida como la disminución del volumen ocupado por una misma masa de suelo, resultado de la reducción de vacíos por acción mecánica de las operaciones de labranza, o por el re-arreglo de las partículas elementales del suelo cuando ocurre el desecamiento (Guerif, 1987). Desde el punto de vista agronómico, procesos como la compactación conducen a una modificación del volumen de poros del suelo que afecta, en mayor o menor medida, el desarrollo del cultivo. De ese volumen dependen tanto los fenómenos de transferencia de calor, gases, agua y solutos, como las propiedades mecánicas de resistencia a la penetración y resistencia a la rotura (Sánchez-Girón, 1996). Cuando un suelo presenta compactación o drenaje interno impedido, el crecimiento de las raíces es



restringido, además de que se limita la captura de humedad y se incrementa la escorrentía y la erosión, lo que da como resultado cultivos con un desarrollo radicular restringido en el horizonte superficial que nunca llegan a alcanzar su potencial de producción (Rice, 1983).

La compactación del suelo a 40 cm de profundidad o más, es causada por el paso repetido de tractores (compactación por llantas) y de implementos (compactación a profundidad por presiones verticales). También otros factores que influyen en la compactación son el contenido de humedad y la textura del suelo. Las prácticas de labranza tienden a compactar el suelo, sin embargo las practicas mas óptimas evitan la circulación excesiva de ruedas lo que reduce el impacto de la compactación (Hunt, 1986). Los pasos en condiciones muy húmedas provocan daños a la estructura del suelo. Las condiciones óptimas para el paso de tractores y de implementos es cuando el suelo es más friable y ello depende de la interacción entre humedad y textura (Barthelemy *et al.*, 1987).



**Foto. 1** Bloques compactos del suelo arcilloso en Cerrillos, Edo de México, después del paso del arado. 19 de Abril de 2007

## 2.6 Materia orgánica

La materia orgánica es el resultado del proceso de descomposición de los restos orgánicos provenientes de plantas y animales que lleva a la formación de sustancias húmicas en el suelo. La función de la materia orgánica del suelo (MOS) en el mantenimiento de la fertilidad de los suelos ha sido reconocida desde tiempos antiguos (Payán, 2005). En los sistemas de cultivo, la MOS es un componente clave en la fertilidad, en particular en el ciclo del carbono puesto que teóricamente puede ayudar a mantener la fertilidad del suelo (Cobo, *et al.*, 2002). Un ejemplo de ello son los suelos con abundante presencia de materia orgánica, los cuales son más tolerantes a la labranza mecanizada (Hunt, 1986).

La descomposición y disponibilidad de MOS se cree está relacionada con la sucesión de poblaciones de diferentes organismos del suelo (Lee y Pankhurst, 1992), entre ellas las lombrices.

La abundancia y distribución de lombrices están correlacionadas con las variables edafológicas (Ferruzzi, 1994), entre ellas la materia orgánica la cual es la base de su alimentación (Clive, 2004). Se ha demostrado que las lombrices afectan las propiedades del suelo, los procesos y actividades de la microflora, así como el contenido de la materia orgánica, desarrollo y producción de plantas, y estructura del suelo (Schlesinger, 1997). Un estudio realizado en diferentes campos mostró que la labranza con el arado estimuló la actividad de las lombrices en la degradación de materia orgánica, sin embargo se encontró una disminución en cuanto al número de organismos. Esto se atribuye a que los sistemas de labranza tienen diferente impacto en las lombrices, dependiendo de la especie y de la distribución de la población, así como de la época del año (Thaïs *et al.*, 2005). La interacción de las lombrices con la materia orgánica comienza cuando los residuos orgánicos de animales y plantas que caen a la superficie entran al suelo por medio de la descomposición, mientras que en el interior del suelo las raíces en descomposición contribuyen con el aporte de residuos. Es aquí donde se incorporan procesos bióticos, en los cuales bacterias y hongos comienzan con el proceso de descomposición, después entran en acción los segundos descomponedores (las lombrices) quienes transforman la materia orgánica, contribuyendo con el aumento de las sustancias húmicas (Schimel, 2001). De esta manera las lombrices contribuyen de forma natural con la fertilización del suelo (Hobbelen, 2006).

Como se ha mencionado, la MOS es definida como una fracción del carbono del suelo que es formada a partir de una íntima combinación mixta de residuos compuestos de plantas, animales y microbios (Payán, 2005). La MOS tiene diferentes estados de descomposición en la cuales se pueden encontrar sustancias de bajo peso molecular y sustancias húmicas de alto peso molecular (Anderson y Ingram 1993). Se considera que los diferentes estados de descomposición de la MOS pueden ser divididos en fracciones funcionales; las cuales están relacionadas con la textura del suelo. Esta relación se estudia a través de la técnica granulométrica y densimétrica, mediante la cual se separa la MOS por medio de tamices de diferentes tamaños de malla. Posteriormente se realiza un lavado con agua y después por diferencia de densidades, mediante la inmersión de la MOS en un líquido de densidad conocida (llamado comercialmente LUDOX), se obtienen tres fracciones principales: la fracción ligera, mediana y pesada (Kouakoua, 1998, Payán, 2005).

De las tres fracciones mencionadas se considera que la fracción ligera es la más activa (Gregorich y Ellert, 1993), debido a que esta fracción compuesta de materiales descompuestos del tamaño de limos gruesos y arenas (53-2000  $\mu\text{m}$ ), están libres o atadas a partículas minerales y presentan cambios de tamaño y grado de descomposición en períodos cortos de tiempo, además de que se considera que son un puente entre el humus estable y los nutrimentos que necesita la planta (Theng *et al.*, 1989). Bajo el criterio de estabilidad relativa, las tres fracciones mencionadas de MOS se pueden dividir a su vez en ligeras y pesadas, de las cuales las primeras se descomponen en semanas o meses, mientras que las segundas pueden permanecer en el suelo por años y décadas (Alvarez y Alvarez, 2000, Duxbury *et al.*, 1989). La fracción ligera incluye residuos de raíces, de plantas, de microorganismos y macroorganismos, de partículas de materia orgánica de la superficie del suelo, está enriquecido, de polifenoles y de moléculas como lignina y celulosa. Existe una fracción intermedia entre la ligera y la pesada. La fracción pesada incluye sustancias húmicas y ácidos orgánicos, los cuales están asociados con los minerales del suelo, así mismo esta fracción es más resistente a la actividad microbiana (Six *et al.*, 2002). Cabe mencionar que también existe otra forma de clasificación de las fracciones de la MOS, la cual es la división por componentes vivos y muertos; dentro de los componentes vivos, se considera que del total de carbono orgánico en el suelo, esta parte representa—aproximadamente el 4%, compuesto por las raíces, la fauna y los microbios, mientras que dentro de los componentes

muestras se consideran todos los organismos en cualquier estado de descomposición así como cualquier desecho orgánico como residuos de plantas, hongos y frutos, los cuales contribuyen al resto del total del carbono orgánico del suelo (Theng *et al.*, 1989). En resumen todas las fracciones influyen directa e indirectamente en las propiedades físicas, químicas y biológicas, factores que intervienen en la fertilidad del suelo (Payán, 2005).

## **2.7 Análisis de ADN de lombrices**

El nombre de “lombriz” se aplica a más de 1000 especies de gusanos pertenecientes al filo Anélidos, por lo que la identificación de estos organismos es fundamental para la caracterización de una población. En una parcela pueden encontrarse diferentes especies de lombrices y lo mismo puede ocurrir a diferentes profundidades del perfil del suelo (Rodríguez y Fragoso, 2002). La taxonomía no es suficiente para describir la sucesión de poblaciones por lo que es necesario la aplicación de técnicas moleculares para conocer las relaciones filogenéticas entre los organismos presentes en una muestra (Van den Bygaart *et al.*, 2000).

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la biomolécula que almacena la información genética en los seres vivos. Tiene una estructura tridimensional formada por dos largas cadenas de nucleótidos que forman una doble hélice antiparalela. Cada nucleótido en el ADN está conformado por un grupo fosfato, una molécula de desoxiribosa y una base nitrogenada que puede ser adenina, timina, guanina o citosina. La información genética está contenida en secuencia a lo largo de la molécula de ADN. El ADN puede hacer copias exactas de sí mismo mediante el proceso de replicación, en el cual participa el ácido ribonucleico (ARN) que está formado por nucleótidos formados por ribosas y las bases nitrogenadas adenina, uracilo, citosina y guanina. El ARN actúa como intermediario y complemento de las instrucciones genéticas codificadas en el ADN. Así el ARN es el producto de la transcripción de un molde de ADN, transmitiendo la información genética a las células hijas, cuando estas se dividen (Lehninger, 1987). El estudio de comunidades de animales y microorganismos se ha enriquecido con los métodos de biología molecular que permiten el análisis de biomoléculas como el ADN, comunes en todos los organismos estudiados. Este tipo de análisis es de particular importancia cuando se trata de identificar puntualmente a las especies de organismos, así como sus relaciones filogenéticas (Erseús, 2005).

Desde mediados de los años 90, los métodos para la secuenciación y el análisis de ADN se han vuelto más eficientes lo cual ha facilitado el estudio de las relaciones filogenéticas entre los organismos. El rango de igualdad taxonómica puede ser complementado con análisis moleculares para determinar el rango de igualdad de la clase "Oligochaeta". Con base en el ADN se realizan estudios moleculares útiles para identificar a las especies empleando marcadores. Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden asociar a un rasgo genético; biomoléculas como el ADN pueden considerarse marcadores moleculares pues contienen secuencias de nucleótidos específicas que pueden ser rastreadas e identificadas dentro de una población de organismos (Erseús y Källersjö, 2004). Para el estudio de las poblaciones de lombrices en suelos agrícolas se ha experimentado con diferentes marcadores de entre los cuales destacan los genes 16S, 18S y COI, los cuales son utilizados para establecer las relaciones filogenéticas (Erseús, 2005).

Estos genes presentan regiones específicas en todos los organismos. Al emplear iniciadores diseñados para amplificar secuencias específicas, en este caso de los marcadores moleculares 16S, 18S y COI por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es posible identificar la presencia de dichos marcadores en una muestra de lombrices. Los productos de PCR obtenidos permiten la identificación de los organismos presentes en las muestras al comparar dichas secuencias con las bases de datos disponibles, posteriormente una muestra purificada se procesa para la secuenciación. En el caso de las comunidades de lombrices la información aportada por los métodos moleculares puede completarse con estudios morfológicos (Erseús *et al.*, 2002).

La comparación de las secuencias del gen 16S ha permitido establecer relaciones filogenéticas entre las lombrices. Jamieson *et al.* (2002) analizó secuencias obtenidas a partir de tres diferentes genes: 28S, 12S y 16S rADN, observando que el gen más adecuado para establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos estudiados era el 16S rADN. Por otra parte, Beauchamp *et al.* (2001) mostró que existían diferencias a nivel genético en las secuencias entre las dos poblaciones de lombrices en Norte América y Europa al emplear como marcador al gen 16S rADN mitocondrial.

El gen 18S rADN se ha empleado para determinar la semejanza, entre las clases Crassicitellates (representado por tres especies de lombrices) y Enchytraeidae (representada por tres especies) (Siddall *et al.*, 1998). Recientemente Erseús y Källersjö (2004) confirmaron

la confiabilidad del gen 18S para estudios de semejanza al determinar esta relación entre los taxones Enchytraeidae y Metagynophora, pues sus resultados mostraron que todos los *Oligochaetous clitellates* mantienen esta relación en las secuencias por medio de este gen. El COI es un gen que también se utiliza para establecer la filogenia entre organismos, un estudio preliminar de secuencias del COI mtADN corroboró las relación genética entre los géneros *Tubificidae* y *Olavius*. Cabe mencionar que en el establecimiento de otras relaciones dentro de la comunidad de *Oligochaetous clitellata*, el gen resulta variable, sin embargo se puede considerar como un buen marcador. (Nylander *et al.* 1999). La combinación del análisis de los genes 18S y COI para establecer la relación filogenética entre 83 especies de clitellate se ha reportado como adecuada para optimizar y dar confiabilidad a los resultados (Siddall *et al.*, 2001). Debido a lo anterior consideramos que el empleo de los tres marcadores moleculares referidos nos permitirá determinar de manera confiable las relaciones filogenéticas en la población de lombrices estudiada.

### 3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el impacto de diferentes sistemas de labranza sobre la población de lombrices de tierra y la estructura del suelo

Objetivos específicos:

- Comparar la cantidad de organismos así como la biomasa de las poblaciones de lombrices bajo diferentes sistemas de labranza (Rastra; Arado+rastra; Multiarado+rastra y Multiarado cruzado+rastra).
- Comparar los cambios físicos del suelo producidos por los sistemas de labranza y las lombrices.
- Identificar la especie de lombriz presente en el sitio

### 4. HIPÓTESIS

La hipótesis global que se plantea en este trabajo es que a mayor mecanización mayor nivel de efecto directo en la población de lombrices y a las propiedades físicas del suelo.

- ✘ Los sistemas de labranza impactarán en diferentes grados a la población de lombrices: a mayor intensidad de mecanización menor población y biomasa de lombrices de tierra:

Multiarado cruzado < Multiarado < Arado < Rastra

- ✘ Las propiedades físicas del suelo arcilloso se mejorarán en el tratamiento con menor intensidad de labranza

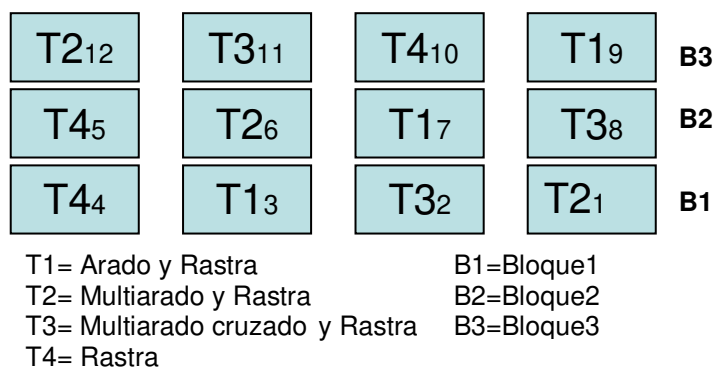
## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Zona de estudio

El presente proyecto se desarrolló en el Valle de Toluca-Atlacomulco, Estado de México dentro de las instalaciones de la UAEM, ubicada en los 19° 43' 37" (mínima) y 19° 43'67" (máx) de latitud norte y 99° 42' 12" (mín) y 99° 52'48" (máxima) de longitud oeste del meridiano de Greenwich. El área de estudio seleccionado fue el campo experimental de producción agrícola de la UAEM en el cual se ha trabajado con maíz de alto rendimiento (VS200, 'cv. Gavilán') por medio de tecnología mecanizada y riego.

### 5.2 Diseño del experimento

El campo experimental fue dividido en 12 parcelas de 20 m × 10 m a las cuales se les asignaron a cada uno de los tres bloques los 4 tratamientos de labranza mecanizada con tres repeticiones. La aplicación de los tratamientos en el campo aparece representada en la Figura 4.



**Figura 5 Distribución de los tratamientos en campo**

Dentro de cada parcela se seleccionaron aleatoriamente tres puntos y en cada uno de ellos se obtuvieron tres muestras de suelo. Cada muestra de suelo consistió de un monolito de 10 x 10 x 15 cm (ancho, largo y profundidad). En cada fecha de muestreo se hicieron



determinaciones de la población de lombrices y orificios de galerías. Las variables del suelo medidas fueron humedad, resistencia mecánica, materia orgánica y el número de lombrices.

También se estimó el rendimiento de rastrojo a partir de los datos de rendimiento en grano proporcionados por el Dr. Francisco Gutiérrez Rodríguez, encargado de área experimental bajo estudio. La resistencia mecánica se obtuvo en puntos cercanos al lugar donde se tomó el monolito, con tres mediciones por unidad experimental. El índice de cosecha para el cultivar fue de 0.3.

### **5.3 Fechas de muestreo**

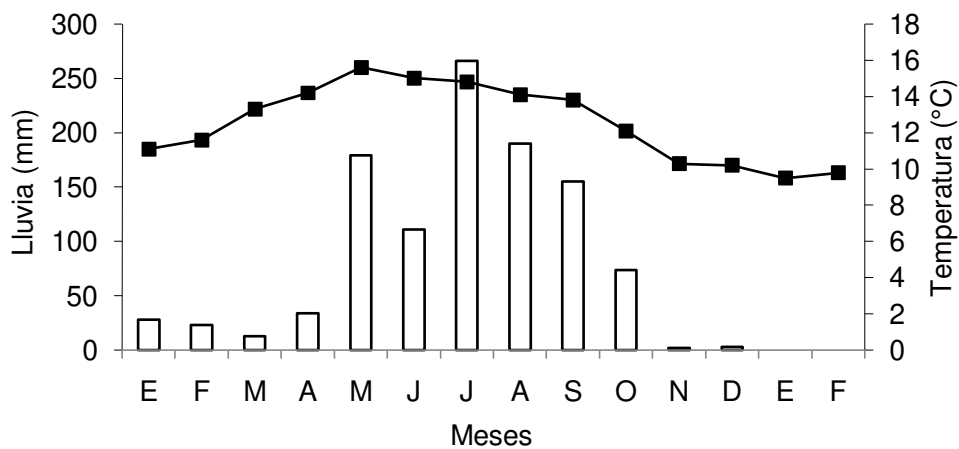
Las mediciones se realizaron en tres fechas: antes de la siembra (19 de Abril del 2007), a la madurez fisiológica del cultivo de maíz (16 de noviembre del 2007) y después de la cosecha (17 enero del 2008). La toma de muestras se efectuó con una pala plana; el suelo se depositó en bolsas de plástico que se sellaron herméticamente, se etiquetaron con los datos de campo y se transportaron al laboratorio donde se acondicionaron de acuerdo a las pruebas a realizar (López y López, 1990).

En el Cuadro 1 se presentan calendarizados los datos climáticos, las prácticas agrícolas aplicadas y las fechas de muestreo.

**Cuadro.1** Calendario con datos climáticos, prácticas agrícolas y fenología del cultivo

Abreviaciones: ▼= Siembra; ↑= Germinación; Fecha de los Muestreos: 1° (19/04/07); 2° (16/11/07) y 3° (17/01/08); HER=Herbicida y TAB= Tableo

Mes	E F	M A	M J	J A	S O	N D	E
Temperatura (°C)	11.1 11.6	13.3 14.2	15.6 15.0	14.8 14.1	13.8 12.1	10.3 10.2	9.5
Prácticas Agrícolas		RIEGO	RIEGO Escarda y Herbicida				
Fenología del Maíz		▼↑			Floración	Cosecha	
Meses lluviosos			XX X	XXX XX	XX X		
Muestreo		1°				2°	3°



**Figura 6** Precipitación y temperatura mensual en 2007-2008 (mm)

#### 5.4 Determinación de humedad

Aparte, se recolectaron muestras de suelo en campo a una profundidad de 0 a 15 cm, y se colocaron en una bolsa de plástico para evitar evaporación. Se determinó la humedad por el método gravimétrico. Se pesaron en húmedo las muestras y se procedió a secar las muestras en una estufa por 48 horas a 105° C, para pesarlas posteriormente y obtener el porcentaje de humedad por medio de la formula:

$$W = [g \text{ H}_2\text{O} / g \text{ de suelo seco}] \times 100 \text{ (Porta, 1986)}$$

#### 5.5 Resistencia mecánica

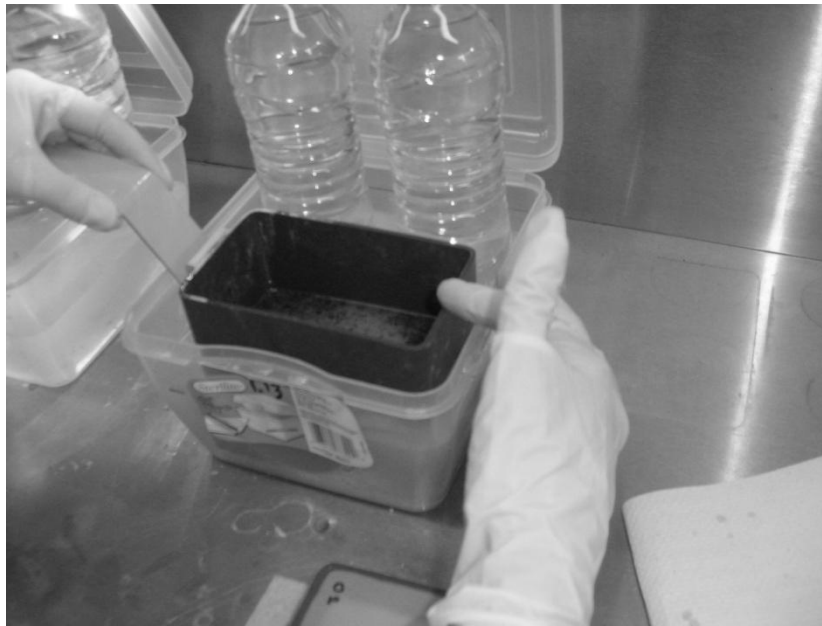
La resistencia mecánica se obtuvo con un penetrómetro portátil digital con capacidad para medir resistencias de hasta 50 kg y a 50 cm de profundidad (marca Bush) y se hicieron tres mediciones al azar por parcela en las tres fechas. La inserción del cono del penetrómetro se realizó manualmente y hasta una profundidad de 50 cm. Cuando la superficie del suelo arcilloso se encontraba seca se rebasó la capacidad de fuerza del medidor y en esos casos se procedió a retirar cuidadosamente la capa de suelo endurecido en los tres puntos de inserción

de cada parcela, y se procedió con las inserciones a partir de los 10 cm de profundidad del suelo. Los datos fueron tabulados y analizados bajo el modelo GLM (SAS, 2001). Los promedios y desviaciones estándar fueron graficados.

## 5.6 Materia orgánica en el suelo (MOS)

Se distinguieron tres fracciones de materia orgánica usando los criterios de tamaño y densidad de la MO (Payán, 2005). El procedimiento para separar la materia orgánica se realizó al moler la masa de suelo en un mortero y se hizo pasar por un tamiz (de 4 mm de malla) hasta obtener 300 g de suelo, de los cuales se tomaron 100 g, los que se lavaron en agua corriente sobre un tamiz de 150  $\mu\text{m}$  por un tiempo aproximado de 40 minutos para separar la arena de la arcilla y el limo. Esa muestra libre de limo y arcilla, se pasó a un recipiente y se procedió al decantado (de aproximadamente 15 s) en el que se tomó el sedimento, el cual contenía un mínimo de arenas y se almacenó en pequeños frascos marcando el tratamiento y la repetición. Se procedió a la separación de las fracciones de materia orgánica. La separación se realizó de acuerdo a lo propuesto por Meijboom *et al.*, (1995), que se utiliza como medio de separación una suspensión de sílice (nombre comercial Ludox) la cual, dependiendo de la concentración de la mezcla sílice-agua se obtienen diferentes densidades, útiles para separar fracciones cuyo límite de densidad está previamente definido. Las muestras de suelo sin arena se sumergieron en el líquido Ludox (densidad de  $1.4 \text{ g cm}^{-3}$ ) por tres minutos logrando con ello que se dispersará y concentrará en la superficie del líquido la fracción ligera más la intermedia (juntas). En el fondo permaneció la fracción pesada, todo dentro de un colador de malla de 150 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). La fracción flotante (ligera e intermedia) se recuperó con una cuchara de plástico y con lavados de agua destilada con una pipeta por presión para retirar el sobrante adherido a las paredes el colador. Esta muestra se sumergió nuevamente en Ludox pero a una densidad de  $1.13 \text{ g cm}^{-3}$  en donde nuevamente se fraccionó, quedando en la superficie la materia orgánica ligera y en el fondo la materia orgánica intermedia. Después se recuperaron las diferentes fracciones de materia orgánica, se secaron en una estufa a  $55^\circ \text{ C}$  por 48 horas para después ser pesadas y obtener la base de datos. Esta técnica presenta ciertas ventajas con relación a otros métodos

mencionados en la bibliografía: es económica, el medio usado no es tóxico y permite el fraccionamiento de muestras de una manera fácil y eficaz.



**Foto 2.** Materia orgánica en Ludox

### **5.7 Estimación del rendimiento de rastrojo**

Las parcelas bajo estudio han recibido aportes de residuos de la cosecha de maíz durante los cuatro años previos al 2007, lo cual es una práctica que favorece el mantenimiento de la MO en el suelo y puede también favorecer la población de lombrices. El rastrojo dejado sobre el suelo en 2006 se estimó utilizando la fórmula de Índice de Cosecha ( $IC = (RG)/(RG+RR)$ ), donde RG = Rendimiento en Grano del maíz, RR = Rendimiento de Rastrojo aéreo (hojas, tallos, y espigas). La información sobre el rendimiento en grano del 2006 fue proporcionado por el Dr. Francisco Gutiérrez Rodríguez. La estimación del rendimiento de rastrojo tuvo los siguientes supuestos: (a) un IC de 0.3 para cultivares híbridos (DeLougherty y Crookston, 1979); y (b) 20% (biomasa,  $\text{ton ha}^{-1}$ ) del total del rastrojo, dejado sobre el suelo después de la cosecha.

### **5.8 Número de orificios de galerías en muestras de suelo**

Para determinar el número de orificios de galerías presentes en el suelo se tomó una fotografía digital (cámara Samsung, modelo Digimax L60) sobre la superficie inferior de los bloques muestreados (10x10 cm) de suelo, tomados de 0-10 cm en la superficie del suelo. Se procedió posteriormente a contar el número de orificios en las imágenes fotográficas

## **5.9 Colecta de lombrices de tierra**

El muestreo de lombrices se realizó manualmente en un punto de cada parcela (Cotín, 1986). La colecta de organismos se llevó a cabo rompiendo y desagregando los terrones manualmente y con ayuda de un cincel de metal. Las lombrices se contabilizaron en campo y se introdujeron en bolsas para ser estudiadas en laboratorio. Se midió la longitud (lombriz estirada), peso (en balanza granataria digital) y se determinó el estadio en el que se encontraban (juvenil y adulto), esto se realizó por medio de la identificación morfológica de los organismos. Las características morfológicas para adultos es que presentan de forma visible y bien desarrollada el cóitelo (anillo anterior a la cabeza) mientras que los juveniles no lo presentan.

## **5.10 Análisis molecular**

### **5.10.1 Preservación de las muestras**

Para la extracción del ADN de lombrices procedentes de la parcela experimental se realizaron ensayos previos conducentes a determinar el método de preservación y el tejido más adecuados para el análisis filogenético de dichos organismos. Se colectaron 10 lombrices por cada parcela y fueron preservadas en tubos de plástico estériles con 40 ml de etanol al 99% hasta llegar al laboratorio. Las lombrices fueron embasadas en bolsas de plástico herméticamente cerradas con etanol al 99%, se colocaron dentro de una hielera y fueron enviadas al laboratorio de la Universidad de Bielefeld, Alemania donde se realizaron los análisis moleculares.

### **5.10.2 Extracción del ADN**

Se realizó la extracción de ADN de las lombrices procedentes de las parcelas. Se realizó la extracción de ADN a 24 muestras (4 tratamientos por 3 repeticiones por 2 lombrices por unidad experimental). La extracción del ADN de las lombrices se realizó a partir del músculo de la parte frontal, empleando el paquete Promega wizard SV Genomic DNA Purification System de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Erseús *et al.*, 2002).

Antes de iniciar la extracción del ADN se tomaron 20 mg de muestra de músculo frontal por organismo, el tejido fue sometido a una solución digestiva (Cuadro 2), durante 18 h a 5° C. Del producto de esta digestión se extrajo el ADN.

**Cuadro 2.** Solución digestiva por muestra para 20 mg de músculo

Reactivos	Volumen
Solución de lisis del núcleo	200 µl
0.5M EDTA (pH 8)	50 µl
Proteinasa K 20mg/ml	20 µl
Solución A RNase 4mg/ml	5 µl
Total	275 µl (por muestra)

Los extractos de ADN obtenidos se purificaron empleando cloroformo. Se añadió 2 veces el volumen de cloroformo a cada muestra, se agitaron con un vortex y se centrifugaron por 5 min a 13000 rpm. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1.5 ml, a los cuales se les añadió isopropanol al 100%, permitiendo la precipitación del ADN por 1 h. El ADN precipitado se transfirió a una columna de filtración Millipore y se lavó cuatro veces con etanol al 70%, centrifugando la columna por 3 minutos a 13000 rpm entre cada lavado. Finalmente se eluyó el ADN con una solución de agua destilada con 2 µl de RNasa y 250 µl de nucleasa; los extractos se preservaron a -20° C.

### 5.10.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los segmentos de los genes 16S, 18S y COI se empleó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Erseús y Källersjö, 2004). Para cada reacción se preparó una solución madre cuyos componentes se indican en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Solución madre para la amplificación de muestras de tejido

Reactivo	Volumen (ml)
DNA de lombriz	5.0
10X buffer	3.0
Taq polimerasa	2.0
MgCl <sub>2</sub>	1.8
dNTPs	0.6
Iniciador 1	1.0
Iniciador 2	1.0
H <sub>2</sub> O destilada	20.0

Los iniciadores empleados para la amplificación de los genes 16S, 18S y COI se muestran en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Iniciadores para la amplificación de los genes 16S, 18S y COI

Gen	Secuencias	Referencia
16Sar	CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT	Pop <i>et al.</i> , 2003
16Sbr	CCG CTY TGA ACT CAG ATC AYG T	Pop <i>et al.</i> , 2003
18S	CCT GTT TGA TCC TGC CAG T	Pop <i>et al.</i> , 2003
18Srev	TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC	Pop <i>et al.</i> , 2003
COI	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	Pop <i>et al.</i> , 2003
(HCO2198)	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Pop <i>et al.</i> , 2003
COI(LCO1490)		

Una vez preparada la mezcla madre se añadió el ADN molde de cada extracto y se procedió a la amplificación. Las condiciones de termociclado empleadas se muestran en el Cuadro 5.



**Cuadro 5.** Condiciones en las que se llevó a cabo el termociclado.

Procesos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicialización	94° C	5 min	1
Desnaturalización	94° C	1 min	35
Anillamiento	56° C	1 min	35
Extensión	72° C	2:30 min	35
Elongación final	72° C	10 min	1

Una vez concluido el termociclado, los productos de la PCR se analizaron por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 130 V por 30 min. Se cuantificaron las pares de bases por medio de un testigo teñido con bromuro de etidio, comparándolo con un registro preestablecido consistente de una tabla con el número de los pares de bases. Para cada muestra se cargaron 15  $\mu$ l de producto de PCR; se empleó el marcador de pares de bases Bio-Budget para verificar el tamaño de los productos obtenidos con cada par de iniciadores correspondientes a los genes 16S, 18S y COI. Una vez verificada la calidad y tamaño de los productos de PCR, por medio de un espectrofotómetro, se realizó la secuenciación. El método empleado para el anillamiento fue Bioedid.

### 5.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó por medio de un modelo lineal generalizado (GLM) para cada una de las variables dependientes, las cuales fueron número de lombrices, peso, longitud y estadío, número de galerías, humedad del suelo, materia orgánica del suelo (ligera, intermedia y pesada) y resistencia mecánica. Los factores de variación fueron: los tratamientos de labranza (4 tratamientos), el tiempo (tres fechas de muestreo).

Se realizó un análisis de regresión múltiple entre variables independientes (humedad del suelo, resistencia mecánica y las tres fracciones de macro-materia orgánica), utilizando el procedimiento "PROC STEPWISE" del programa SAS (Herrera y Barreras, 2005).

## **6. RESULTADOS**

En esta sección se presentan los resultados relativos a las condiciones del área de estudio, la población de lombrices así como las variables de estructura del suelo, materia orgánica y análisis molecular de las lombrices. Los valores promedio de variables del suelo, clima y de la población de lombrices se encuentran en los cuadros Anexos del 3 al 20. En el Cuadro 6 aparecen los resultados del análisis de varianza de cada una de las variables medidas.

### **6.1 Análisis de textura del suelo**

El contenido de arena, limo y arcilla fue de 44.0, 27.4 y 28.6 respectivamente. La clase textural corresponde a un suelo migajón arcilloso.

### **6.2 Humedad del suelo**

En la Figura 7 se presentan los promedios de humedad del suelo en los tres muestreos. Puede observarse que en el muestreo 2 se presentaron diferencias entre tratamientos siendo mayor la humedad en el tratamiento de Multiarado y la menor en Multiarado Cruzado.

### **6.3 Resistencia mecánica del suelo (MPa)**

Los resultados obtenidos de la resistencia mecánica a la profundidad de 15 cm aparecen en la Figura 8. Se puede observar que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos en los tres muestreos. Al comparar los resultados entre muestreos se observa que conforme avanzó el tiempo y el suelo fue perdiendo humedad, aumentó la resistencia mecánica de tal manera que se presentaron ( $P < 0.05$ ) diferencias significativas entre los muestreos (símbolos  $\alpha$ ,  $\beta$ ,

**Cuadro 6.** Significancia estadística de los efectos de la labranza, fecha de muestreo y profundidad de siembra sobre las variables de la población de lombrices.

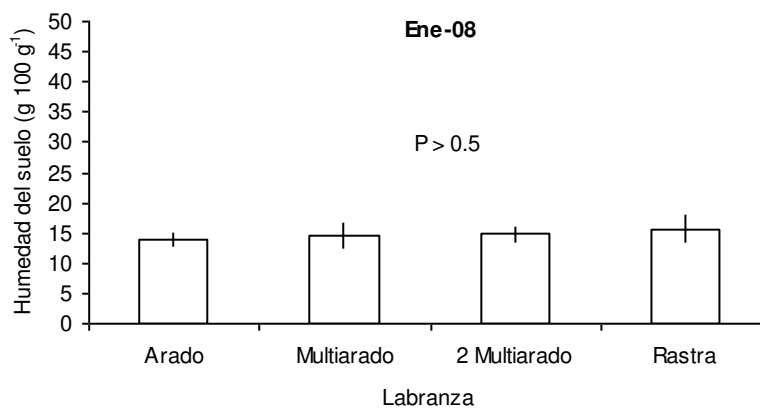
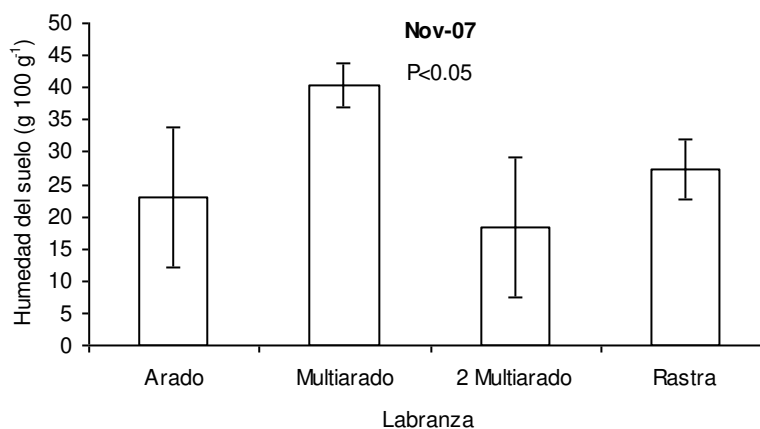
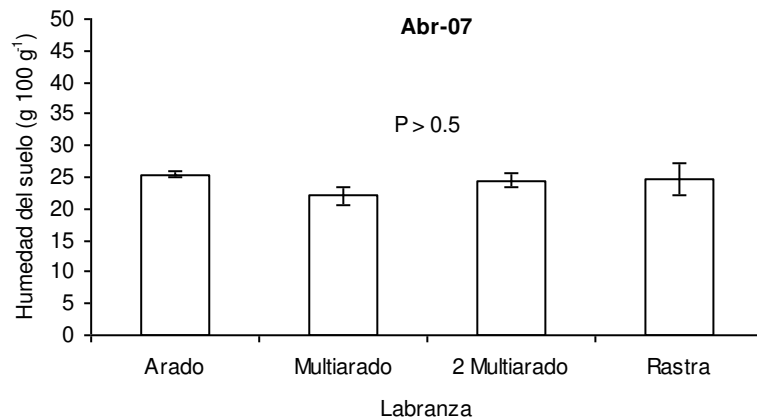
Variable	Lab. (L)	Fecha (F)	Prof (P)	LxF	LxP	FxP	LxFxP
Abundancia Juveniles (m <sup>-2</sup> )	NS	0.002	NS	NS	NS	NS	NS
Abundancia Adultos (m <sup>-2</sup> )	NS	0.006	NS	NS	NS	NS	NS
Abundancia Total (m <sup>-2</sup> )	NS	0.0007	NS	NS	NS	NS	NS
Biomasa de Lombrices(g m <sup>-2</sup> )	NS	0.0003	NS	NS	NS	NS	NS
Tamaño de Lombrices (cm)	NS	NS	0.0008	0.005	0.004	NS	NS
Orificios de Galerías (100 cm <sup>-2</sup> )	0.005	0.019	--	NS	--	--	--
Humedad del Suelo (g 100 g <sup>-1</sup> )	0.008	0.0001	--	0.002	--	--	--
Resistencia a la penetración (MPa)	NS	0.0001	--	NS	--	--	--
Materia Org. Ligera (g 100 g <sup>-1</sup> )	NS	NS	--	NS	--	--	--
Materia Org. Intermedia (g 100 g <sup>-1</sup> )	NS	NS	--	NS	--	--	--
Materia Org. Pesada (g 100 g <sup>-1</sup> )	NS	NS	--	NS	--	--	--
Rendimiento de Rastrojo (ton ha <sup>-1</sup> )	NS	--	--	--	--	--	--

(1) Los orificios se determinaron solamente en la capa de 0-15 cm

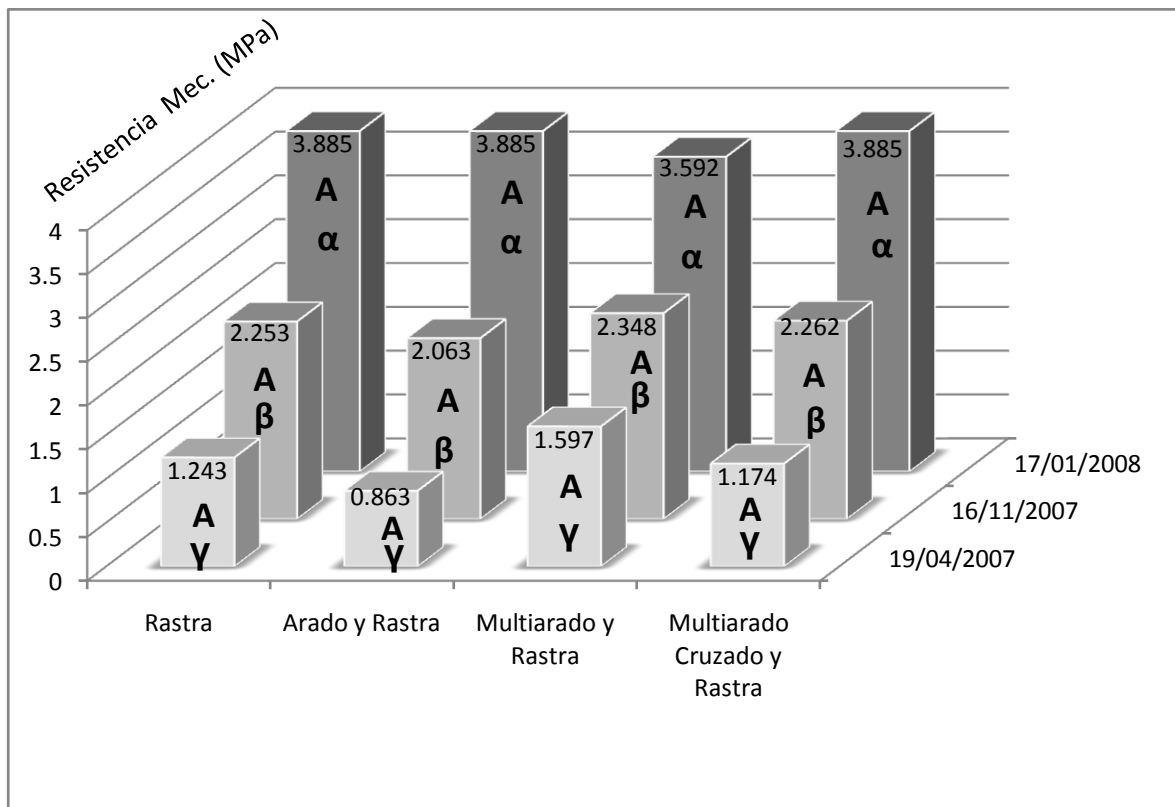
(2) Resistencia a la penetración corresponde a los promedios obtenidos a los 15 cm de profundidad del suelo.

(3) Las fracciones de macro-materia orgánica se determinaron a los 0-15 cm de profundidad del suelo

**Figura 7.** Humedad del suelo (g 100 g<sup>-1</sup>) para los cuatro tratamientos en las tres fechas de muestreo.



**Figura 8** Resistencia mecánica del suelo (MPa) a una profundidad de 15 cm en tres fechas diferentes. Letras iguales indican identidad de grupos de promedios dentro de un mismo muestreo. Símbolos iguales indican identidad de promedios entre fechas de muestreo.  $P < 0.05$ .



γ). Al tercer muestreo (17 enero del 2008) se superó el valor de 3 MPa, el cual es considerado como el límite por arriba del cual las raíces no pueden desarrollarse (Materechera et al., 1992). Ello indica que independientemente del tratamiento aplicado, el suelo arcilloso de las tierras de cultivo tiende a compactarse con el tiempo debido a la interacción entre contenido de humedad y comportamiento de las arcillas (Porta, 1986).

## 6.4 Materia Orgánica

Los resultados obtenidos de la fracción ligera de la materia orgánica (MOL) en el estrato del suelo de 0-15 cm aparecen en la Figura 9a. Se puede observar que el contenido de MOL no se vio afectado por los tratamientos de labranza y tampoco por las diferentes fechas del muestreo.

Los resultados obtenidos de materia orgánica intermedia aparecen en la Figura 9b. Se puede observar que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, ni a través del tiempo, lo que indica que el contenido de materia orgánica en suelo es independiente del efecto de los tratamientos.

Se debe mencionar que la materia orgánica intermedia normalmente presenta cambios en plazos de tiempo más largos respecto a la materia orgánica ligera (Meijboom *et al.*, 1995). Los resultados mostrados en la Figura 9b son consistentes con este patrón al no mostrar cambios en el periodo de estudio, por lo que se asume que para ver estos cambios se necesita de un mayor tiempo de estudio.

Los resultados obtenidos de materia orgánica pesada se muestran en la Figura 9c. Puede observarse que es la fracción con mayor masa de las tres estudiadas: (MOP>MOL>MOI) por su asociación con partículas minerales. Al igual que las otras dos fracciones, los tratamientos de labranza y las fechas de muestreo no tuvieron un efecto en el contenido de esta fracción en el suelo.

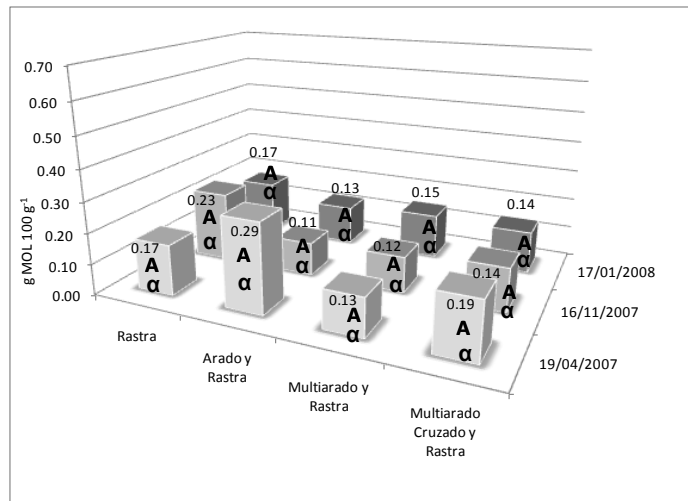
## 6.5 Población, biomasa y longitud de lombrices en el perfil arable del suelo

### 6.5.1 Efecto de la Labranza, Profundidad del Suelo y Fecha de Muestreo en el Número de lombrices

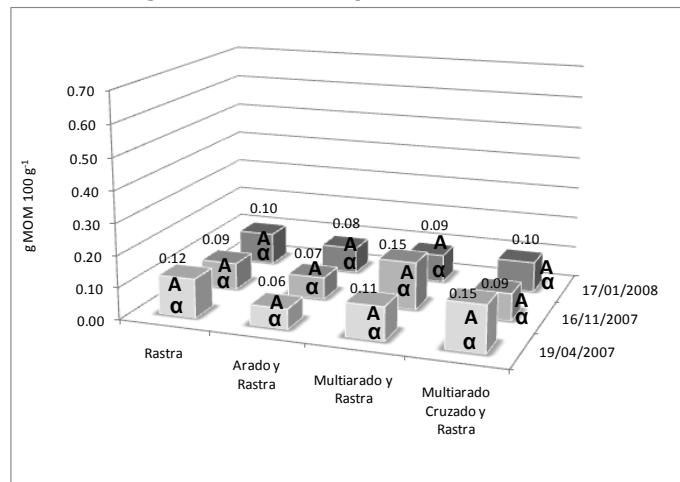
El número de lombrices (juveniles, adultas y totales) presentes en las parcelas experimentales se determinó en dos profundidades del perfil arable del suelo: de 0-15 y de 16-30 cm de profundidad. En el Cuadro 6 puede observarse que los factores Labranza y Profundidad del Suelo no tuvieron efectos significativos en las variables de la población de lombrices. En cambio, el factor Fecha de Muestreo si

**Fig. 9** Contenido de materia orgánica en las tres fracciones de densidad

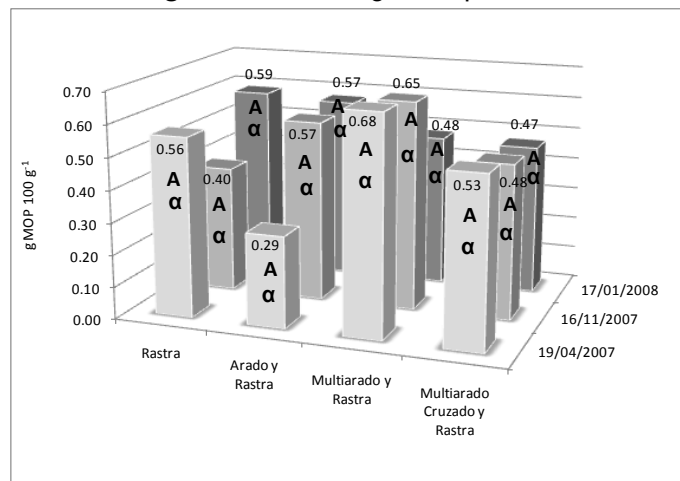
**Fig. 9a** Materia orgánica ligera



**Fig. 9b** Materia orgánica intermedia

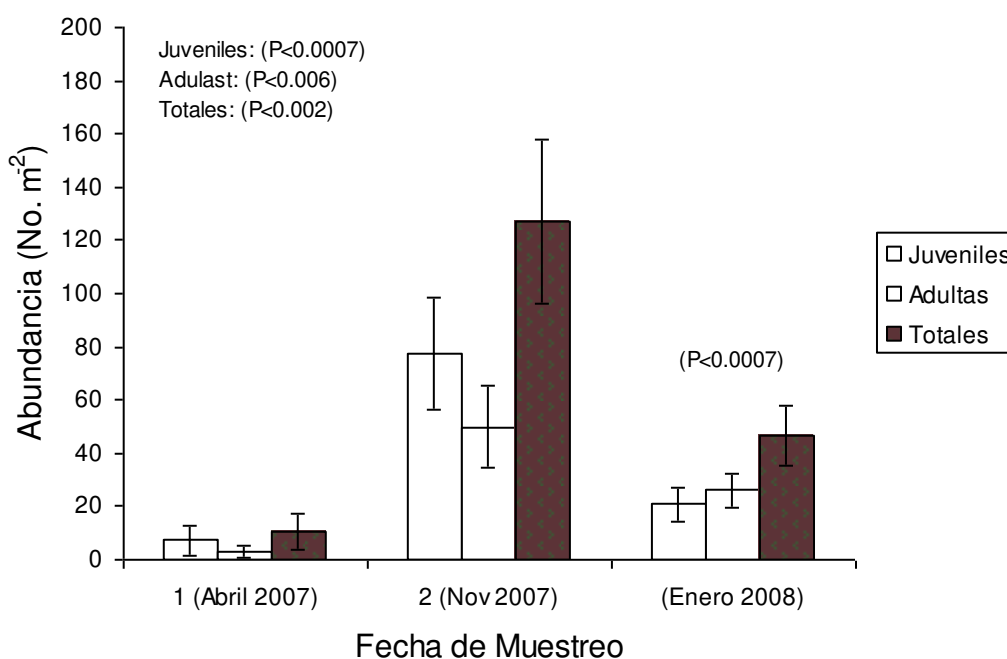


**Fig. 9c** Materia orgánica pesada



fue significativo para esas variables (Cuadro 6). En la Figura 10 aparecen los resultados de número de lombrices en los dos estados de desarrollo así como la suma de ambos. La abundancia menos se encontró en el muestreo número 1 (Abril de 2007, emergencia del maíz) Para el mes de noviembre (segundo muestreo) se observó la máxima abundancia, para los dos estadíos, siendo mayor la cantidad de juveniles. En el muestreo 3 (Enero de 2008) se observó una caída de la población de lombrices.

**Figura 10.** Efecto de la Fecha de Muestreo sobre la abundancia de lombrices; promedio y desviación estándar para individuos juveniles, adultos y totales (n=24).

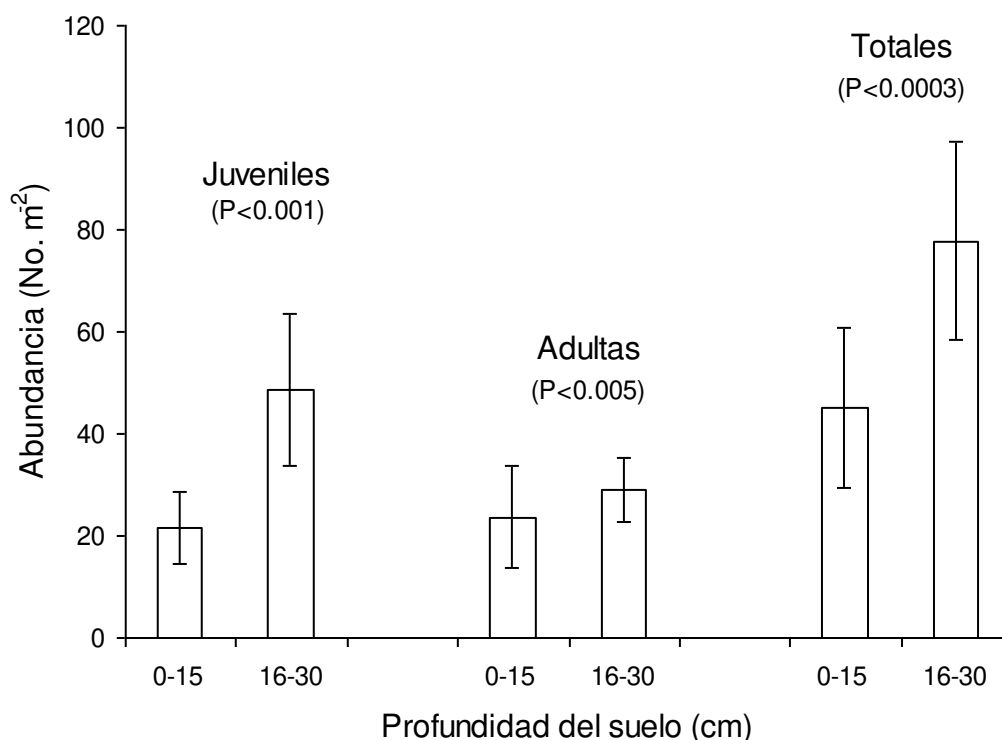


En cuanto el efecto de la profundidad de siembra, se observó un efecto significativo sólo para el tercer muestreo. (Enero 2008). En este caso

tanto las lombrices juveniles, adultas y totales fueron más abundantes en el estrato de 16-30 cm de profundidad (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de la profundidad de siembra sobre la abundancia de lombrices (promedio y error estándar) Tercer Muestreo (17 de Enero de 2008).

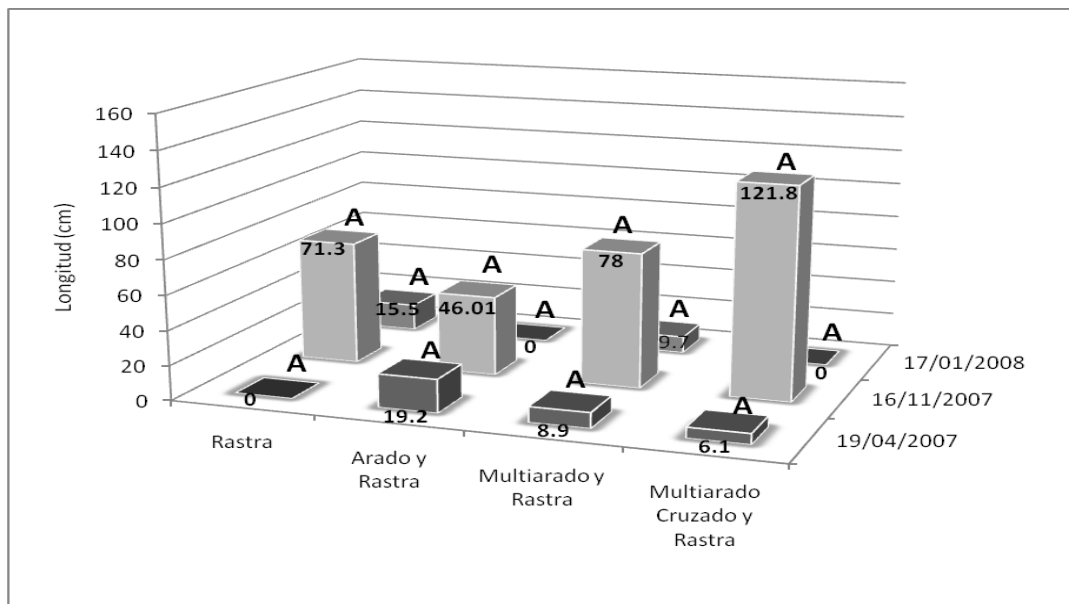


En la Figura 12a aparecen los resultados de la longitud de las lombrices adultas presentes a la profundidad de 0 a 15 cm. Las diferencias de tamaño entre fechas de muestreo no fueron significativas.

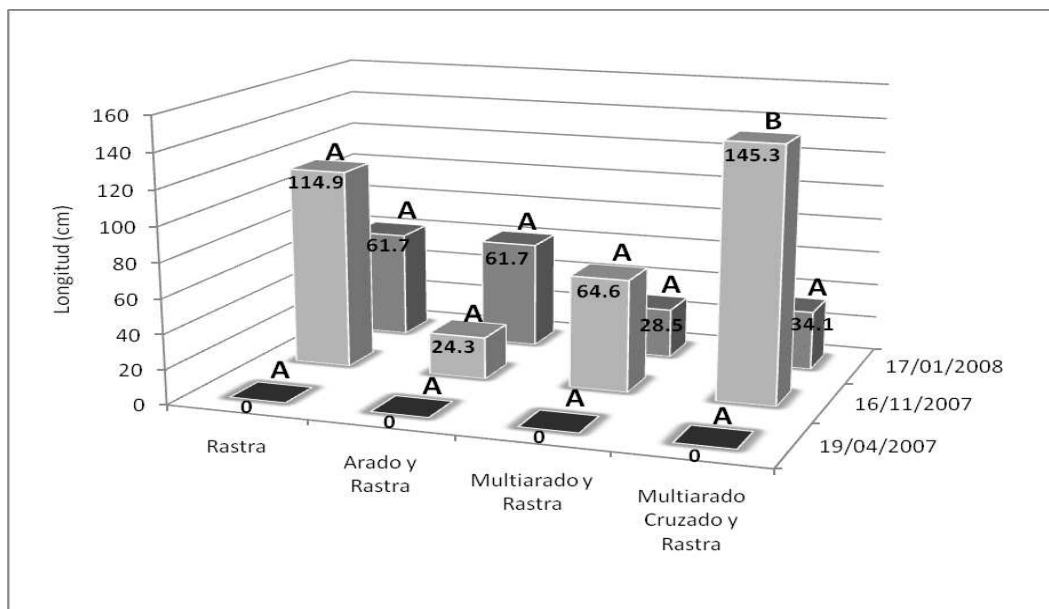
En la Figura 12b se muestran los resultados de la longitud total de las lombrices a la profundidad de 16 a 30 cm. Se puede observar que dado que en el primer muestreo no hubo organismos, no se presentaron datos de longitud. En el segundo muestreo el tamaño de las lombrices varió de manera importante y las diferencias entre los promedios de longitud fueron significativas. Aquellas lombrices que se encontraban en el tratamiento de Multiarado cruzado+Rastra (máxima intensidad mecánica) mostraron los promedios de longitud más altos en comparación con los de Rastra, Arado, y Multiarado.

**Figura 12** Longitud de lombrices adultas en los tres muestreos a una profundidad de (a) 0 a 15cm y (b) 16 a 30cm.

**(a) 0-15 cm**



**(b) 16-30 cm**

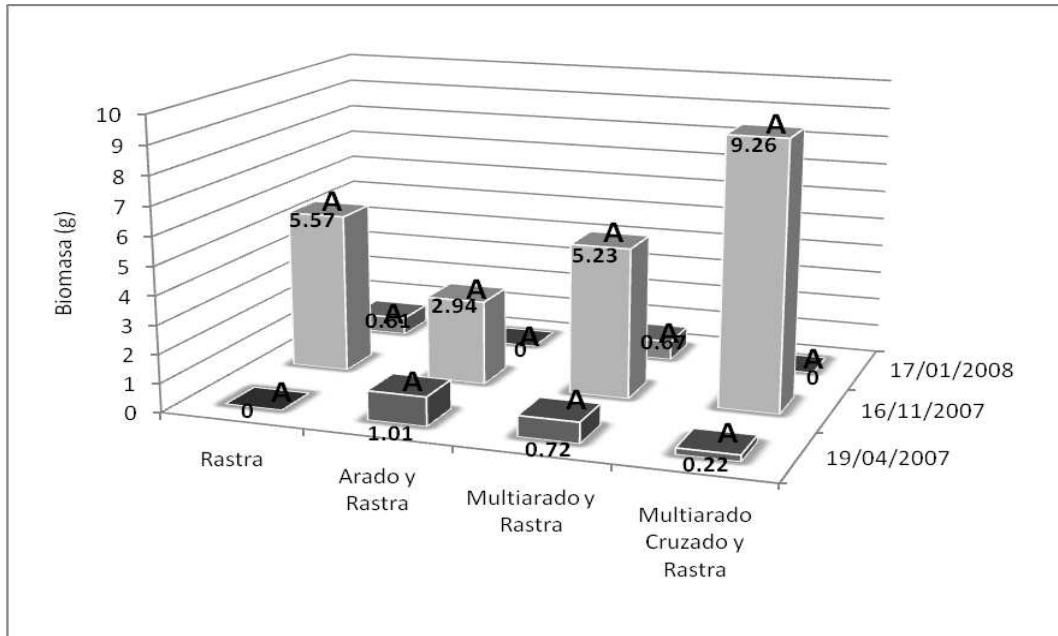


La Figura 13a presenta los resultados de la biomasa total de las lombrices a una profundidad de 0 a 15 cm en el perfil arable del suelo en un volumen de 1200 cm<sup>3</sup>. Se puede observar que la biomasa de lombrices en esta profundidad es baja tanto en el muestreo 1 (Abril del 2007) como en el muestreo 3 (enero del 2008), comparado con los resultados del muestreo 2 (noviembre del 2007). No se presentaron diferencias significativas entre tratamientos de labranza. Tanto en las épocas en que se realizaron el muestreo 1 como en el 3 la humedad del suelo disminuye drásticamente en este estrado del perfil arable, respecto a la humedad del suelo presente en la fecha de muestreo No 2 (Figura 7). El desecamiento en superficie del suelo arcilloso donde se realizó el estudio produce un encostramiento con una resistencia > 3 MPa, lo cual no es un hábitat favorable para las lombrices las cuales muy probablemente emigraron a estratos inferiores del perfil como lo sugieren los resultados de biomasa de lombrices presentes en el estrato de 16- 30 cm (Figura 13b).

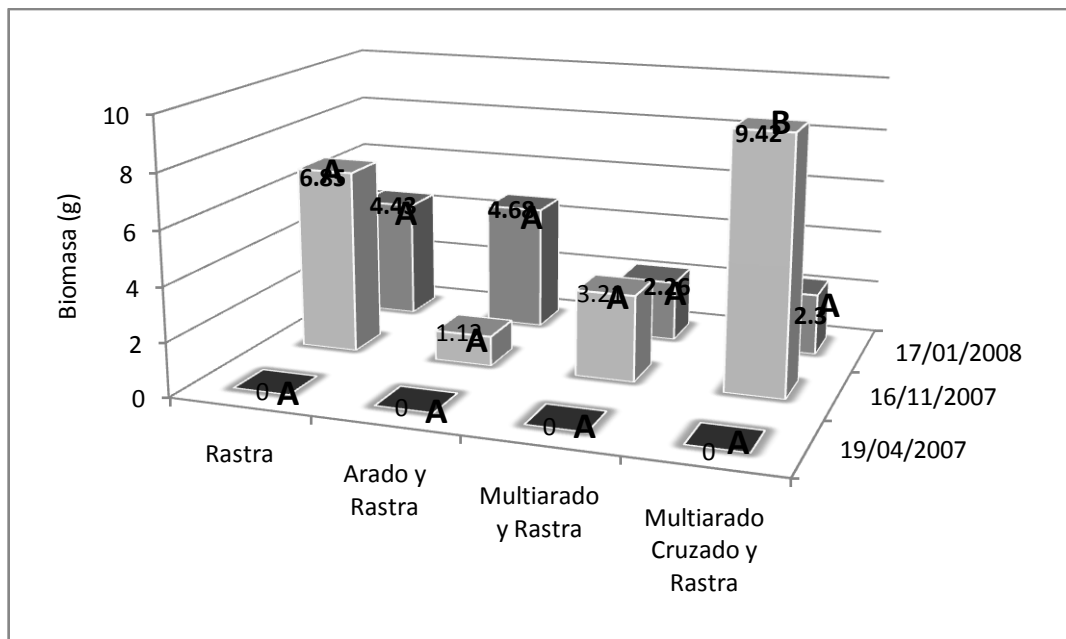
La Figura 13b presenta los resultados de la biomasa total presente de las lombrices en el estrato de 16 a 30 cm en los monolitos de 1200 cm<sup>3</sup>. Se puede observar que en el primer muestreo la biomasa es nula puesto que no se registraron organismos en este muestreo, después en el segundo muestreo la biomasa inicial es alta para después disminuir un poco en el tercer muestreo. La información de las Figura 11 sugiere un movimiento de lombrices del estrado endurecido y seco en superficie (0-15 cm) hacia el estrato más húmedo y menos duro en los 16-30 cm de profundidad del suelo.

**Figura 13.** Biomasa total de lombrices en los tres muestreos **(a)** profundidad de 0 a 15 cm y **(b)** 16-30 cm

**(a) 0 a 15 cm**



**(b) 16 a 30 cm**

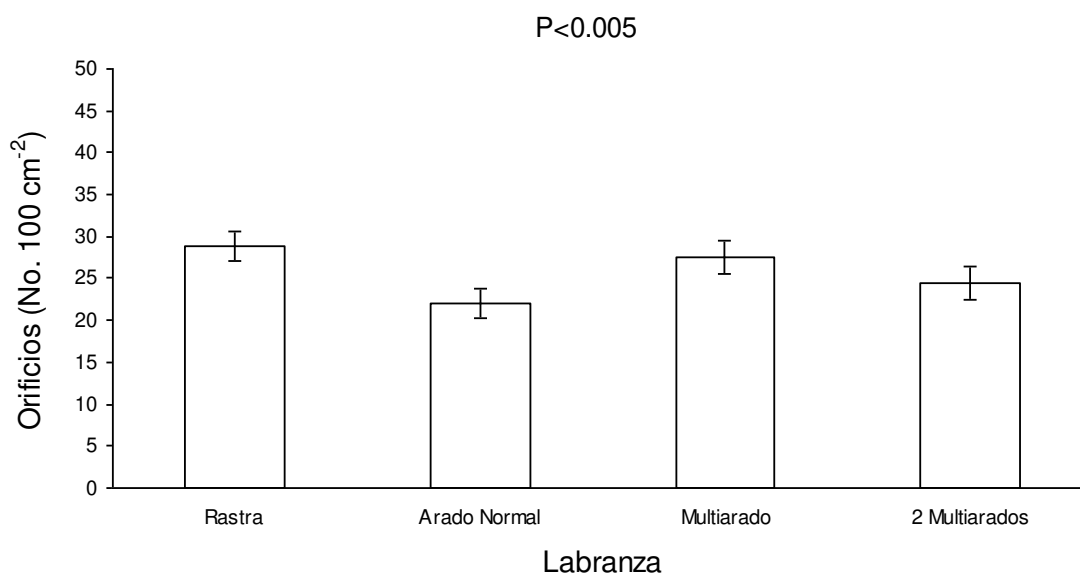


## 6.6 Orificios de galerías producidas por las lombrices

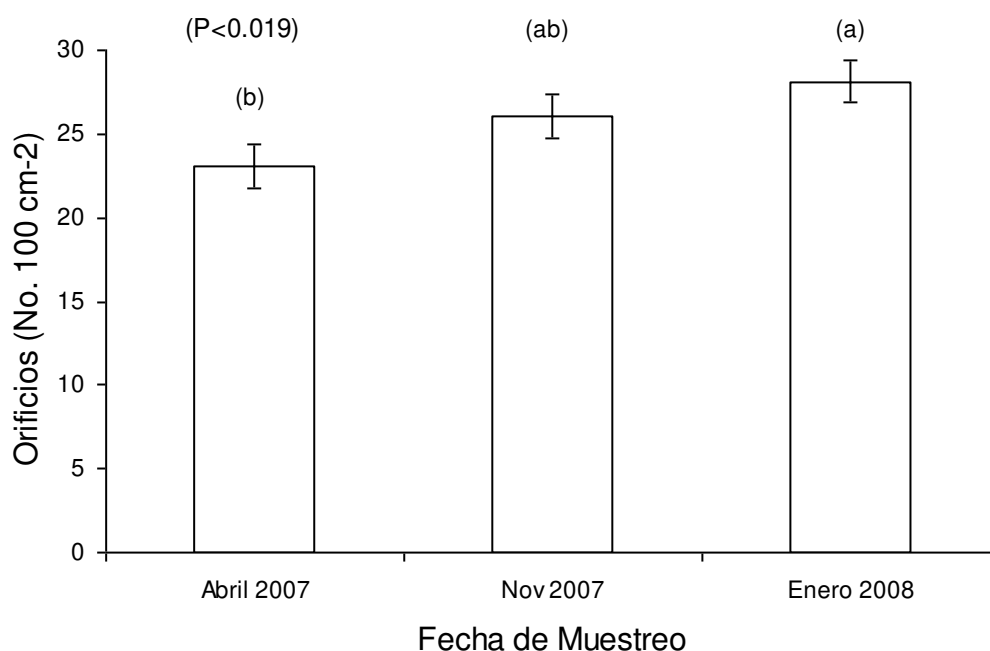
Los resultados de la abundancia de galerías por 100 cm<sup>2</sup> determinada en los terrones localizados entre 0-15 cm, aparecen en la Figura 14. Se presentan en dicha figura los datos promedio de los cuatro tratamientos en las tres fechas de muestreo. El efecto de los tratamientos de labranza fue significativo ( $P < 0.005$ ). La rastra y un paso de multigrado presentaron las cantidades más altas de orificios.

En la Figura 15 aparecen los resultados de la cantidad de orificios de galerías en cada uno de los muestreos. El número de orificios se fue incrementando conforme pasó el tiempo y las diferencias fueron significativas.

**Figura 14** Número de galerías en el suelo (0-15 cm de profundidad) de acuerdo a cada uno de los tratamientos de labranza.



**Figura 15.** Número de galerías en el suelo (0-15 cm de profundidad) de acuerdo a cada una de las fechas de muestreo.



### **6.7 Asociación entre variables del ambiente edáfico (independientes) y de la población de lombrices y orificios (dependientes)**

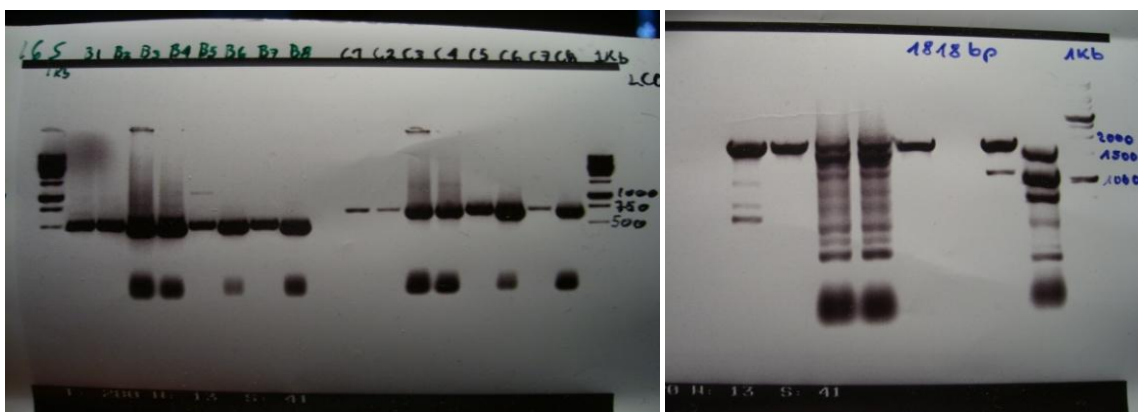
La humedad del suelo y la resistencia mecánica no se correlacionaron con las variables de la población de lombrices en los estadíos de juveniles, adultas o bien la población total. ( $P \geq 0.05$ ). Tampoco se presentó una asociación significativa entre alguna de las variables independientes y la cantidad de orificios de las galerías de las lombrices.

Respecto a las fracciones de material orgánica, cuando el análisis de regresión incluyó los datos de los tres muestreos de las tres fracciones de MO del suelo, así como el rendimiento de rastrojo, contra el número de juveniles, adultas, totales y orificios, los resultados no fueron significativos ( $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, cuando la regresión múltiple fue hecha con los datos de cada fecha de muestreo se encontraron relaciones significativas para la primera fecha (emergencia de plantas de maíz): la población de juveniles estuvo positivamente relacionada con las fracciones intermedias y pesadas de la macro-materia orgánica ( $P \leq 0.02$ ;  $r^2$  parcial

=0.48;  $P \leq 0.02$ ;  $r^2$  parcial 0.26, respectivamente). La población total de lombrices se relacionó positivamente con la fracción pesada de la MO ( $P \leq 0.04$ ;  $r^2$  parcial = 0.35).

## 6.8 Comparación filogenética de las lombrices

Para identificar el gen para el análisis de semejanza genética entre las lombrices de tierra sujetas a diferentes condiciones de labranza del suelo se realizó la amplificación y secuenciación de los genes 16S, 18S y COI. (Esto es metodología)



**Foto 3. Patrón de bandas de los genes 16S (500 pb), COI (750 pb) y 18S (1500 pb)**

Extractos de ADN de lombrices procedentes de cada tratamiento fueron sometidos a la reacción en cadena de la polimerasa para identificar la presencia de los genes referidos. La foto 3 muestra el patrón de bandas obtenido para cada gen. Los resultados muestran que con los iniciadores empleados para la amplificación del gen 18S se obtiene un producto de alrededor de 1500 pares de bases; con los iniciadores empleados para el gen COI se obtienen productos de alrededor de 750 pares de bases y con los iniciadores empleados para el gen 16S se obtienen los productos de menor tamaño, 500 pares de bases.

Al analizar las secuencias obtenidas a partir de los productos de PCR para cada gen, empleando el programa Bioedid, se encontró por medio de un BLAST que las secuencias presentan un elevado grado de semejanza en los aminoácidos presentes en los fragmentos comprados de las cadenas de ADN. Los resultados obtenidos luego de la comparación de las secuencias entre sí mostraron que no se presentaban variaciones significativas entre las

cadena; así mismo al compararse los resultados con la secuencia reportada para *Lumbricus terrestris* en NCBI, indicaron que los organismos presentes en todos los tratamientos corresponden a dicho organismo, originario de Europa y de distribución mundial (Rodríguez y Fragoso, 2002). El resultado del cotejo de la secuencia de nucleóticos de las muestras del sitio de Cerrillos y su correspondencia con lo reportado para *L. terrestris* aparece en anexo.

Rodicio y Mendoza, (2004) mencionan que el gen 16S se utiliza para la identificación en organismos procariontes sin embargo, en el presente trabajo se obtuvieron productos de PCR con iniciadores específicos para dicho gen empleando como molde para la PCR, ADN proveniente de eucariontes como son las lombrices de suelo. Resultados semejantes han sido reportados por Pop *et al.*, (2003) quien empleó el gen 16S para analizar la filogenia de lombrices en el oeste de Europa. Con los iniciadores empleados en este trabajo para amplificar los marcadores moleculares 16S, 18S y COI, se obtuvieron secuencias de diferente tamaño para el 16S: 500 pb, COI: 750 pb y para el 18S: 1500 pb; los iniciadores para amplificar el gen 18S mostraron ser más útiles para la identificación filogenética de las lombrices de suelo pues permitieron la obtención de las secuencias más grandes (1500 pb), permitiendo comparaciones más confiables para la identificación de los organismos.





**Foto 4.** Lombriz proveniente de suelo en Bielefeld



**Foto 5.** Lombriz proveniente de suelo de Cerillos (UAEM, Edo. de México)

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 La población y biomasa de lombrices en relación con los tratamientos y las condiciones de humedad, resistencia mecánica y materia orgánica en el suelo

El presente trabajo surgió de observar en campo una muy alta densidad de lombrices en las parcelas de producción de maíz en las cuales el Dr. Francisco Gutiérrez de la UAEM viene trabando en torno al multiarado, instrumento descompactador del suelo. Los resultados del presente trabajo de tesis confirman esta alta densidad de lombrices. Si se suman las lombrices presentes en los dos estrados de suelo (de 0 a 15 cm y de 16 a 30 cm en una superficie de 20 por 20 cm), se tiene que dicha población llega a alcanzar 20 lombrices adultas en 1200 cm<sup>3</sup>, lo cual equivaldría a 500 lombrices por m<sup>2</sup>. Si consideramos un promedio de 5 g de lombrices en un volumen de 1200 cm<sup>3</sup> de suelo, ello equivaldría a 125 g de lombrices por m<sup>2</sup> y 1250 kg ha<sup>-1</sup>. Galeana *et al.*, (1999) mencionan en su estudio realizado en suelo franco en Chapingo (Estado de México) que la población de lombrices aumentó significativamente en los tratamientos con cobertura de veza en labranza de conservación (268 lombrices por m<sup>2</sup>) comparada con la labranza de conservación con cobertura de cebada (146 lombrices m<sup>2</sup>) en la labranza tradicional. En la zona de raíces de veza se cuantificaron 64 lombrices por m<sup>2</sup> y en la labranza tradicional, la zona de raíces de cebada presentó 48 lombrices por m<sup>2</sup>. La cobertura de veza favoreció el contenido de materia orgánica y la población de lombrices. La comparación anterior permite inferir que la población de lombrices reportada en nuestro trabajo es alta y puede deberse a la disponibilidad de materia orgánica presente en el suelo y de humedad proveniente del riego y de las lluvias.

En cuanto a la hipótesis de que a mayor intensidad de corte y de fuerzas aplicadas al suelo mediante los instrumentos de labranza, menor población de lombrices, los resultados no la confirman. Prácticamente todas las variables analizadas no se vieron afectadas por los tratamientos de labranza. Tomando en cuenta que estos tratamientos han venido siendo aplicados por un período de 4 años se puede establecer que en este lapso de tiempo dichos tratamientos no han afectado las poblaciones de lombrices, probablemente porque dichos tratamientos no han implicado cambios drásticos en humedad del suelo, materia orgánica y

resistencia mecánica. El hecho de que no hayamos encontrado tampoco diferencias en el contenido de tres fracciones de materia orgánica, humedad en el suelo y resistencia mecánica, indica que los sistemas de labranza bajo estudio no alteran las condiciones físicas y químicas en las que crecen las lombrices. Compagnoni y Putzolu (1995) menciona que los sistemas de labranza generan alteraciones indirectamente en la población de lombrices puesto que se afecta principalmente la disposición de materia orgánica, sin embargo en nuestro experimento se observó que la disposición de materia orgánica no fue afectada por los tratamientos utilizados (Figura 10 a, b, y c) por lo que se sugiere que al no ser afectada directamente la disposición de alimento para los organismos éstos se desarrollaron de forma normal dentro de su población cumpliendo con su ciclo de vida de forma natural. Joschko *et al.*, (2005) mencionan que para entender los efectos de labranza en la población de lombrices es necesario tomar en cuenta la información acerca de la distribución espacial de los organismos; esto concuerda con nuestras observaciones en las que la distribución a lo largo de los primeros 15 cm es diferente a la profundidad de 16 a 30 cm puesto que en los primeros muestreos no se encontraron organismos a esta profundidad (Figura 11b). Reeleder *et al.* (2006) mencionan que en campos de maíz donde se han aplicado tratamientos mecanizados, la población de lombrices es baja y con una mayor presencia de juveniles, lo cual fue observado en el primer y tercer muestreo, pero no se atribuye al efecto de los tratamientos mecanizados sino al desarrollo natural de la población

Huerta *et al.*, (2005) mencionan que las lombrices tropicales tienen poca tolerancia a los cultivos tratados con sistemas de labranza mecánica así como a los cambios climáticos, con lo cual cabe suponer que la población de lombrices posiblemente fue afectada por la época del año más que por los tratamientos mecanizados puesto que la evidencia estadística muestra que los tratamientos no tuvieron un efecto significativo en la población de organismos bajo los tratamientos mecanizados.

Reeleder *et al.* (2006) han reportado que en campos de maíz donde se aplicaron tratamientos de arado, la población de lombrices fue baja y con mayor frecuencia de juveniles, por lo que se considera que existe un impacto de los tratamientos en la población de lombrices, sin embargo en este experimento la población de las lombrices parece no haber sido afectado por los tratamientos, puesto que es similar el número de juveniles que el de adultos en la población estudiada (Figura 12 y 13).

Joschko *et al.*, (2005) mencionan que la biomasa de las lombrices también depende de la cantidad de alimento disponible, así mismo Compagnoni y Putzolu (1995) menciona que la labranza con implementos metálicos afecta indirectamente a las lombrices puesto que generan una alta variabilidad en la materia orgánica disponible en el suelo; bajo estas condiciones las lombrices pueden experimentar severas limitaciones de alimento lo que se refleja directamente en la densidad de la población y la biomasa. Sin embargo en el experimento se encontró que al tener una fuente de materia orgánica constante las lombrices no fueron afectadas ni en número (Figura 11) ni en biomasa en la población por los tratamientos mecanizados (Figura 15).

Huerta *et. al.* (2005) observaron que la distribución de las lombrices está determinada entre otros factores por la humedad y la materia orgánica, así mismo cuando hay cambios drásticos en la temperatura existe una alta mortalidad en la población de lombrices, particularmente en los juveniles (Olchawa *et al.*, 2006). En nuestro trabajo predominó la presencia de lombrices adultas respecto a las juveniles (Figura 13).

## **7.2 Efecto de las operaciones de labranza en las propiedades del suelo**

Los resultados aquí reportados sobre las propiedades de humedad, resistencia mecánica y contenido de materia orgánica en suelo sirven para evaluar los sistemas de labranza empleados en la experimentación. Ninguna de esas tres propiedades se vio afectada por los tratamientos aplicados, lo cual significaría que el trabajo de mínima roturación y menor intensidad de tracción y de fuerza aplicada al suelo (la rastra y un paso de multirado) sería el más adecuado para la producción de maíz en la zona. Sin embargo, otros factores deben ser considerados. Por ejemplo, en el presente trabajo no se analizó la profundidad de enraizamiento. Un trabajo específico que tome en cuenta el comportamiento del cultivo en su conjunto es necesario para tener una conclusión definitiva sobre los sistemas de labranza.

## **7.3 Los cambios temporales en las condiciones ambientales y su relación con la población y biomasa de lombrices**

En contraste con la ausencia de efecto por parte de los tratamientos en las condiciones ambientales del suelo y en los datos de población y de biomasa, la época del año influyó significativamente en estos parámetros, debido a que la época. Sin embargo el análisis de regresión no mostró una relación entre los datos de humedad y resistencia mecánica del suelo, contra la abundancia de lombrices y de orificios ( $P > 0.05$ ). Solamente para el primer muestreo se encontró que la población de juveniles se relacionó positivamente con las fracciones intermedia y pesada de la materia orgánica ( $P < 0.02$ ;  $r^2$  parcial de 0.48;  $P < 0.02$ ,  $r^2$  parcial de 0.26).

En el muestreo llevado a cabo en enero de 2008 (tercer muestreo) se registró la mayor caída en la cantidad de lombrices presentes en el suelo. Suponemos con ello que ocurre una mortalidad de lombrices en esta época. Sin embargo también es posible que exista una migración vertical. Un estudio específico se requiere para completar la información del presente trabajo.

#### **7.4 Las galerías de lombrices en el suelo y su relación con la evolución del estado estructural en el perfil arable**

Se encontró que independientemente de la fecha de muestreo estaban presentes entre 20 y 30 orificios de galerías en una superficie de  $100 \text{ cm}^2$ . Ello equivale a 20 000-30 000 orificios en un volumen de suelo de  $1 \text{ m}^2 \times 0.10 \text{ m}$ . Aparte de la gran abundancia de galerías en el suelo, es de llamar la atención que, a juzgar por los datos de un ciclo de cultivo, bajo cualquier operación de labranza aplicada al suelo se tubo la misma abundancia de orificios, lo que sugiere que cualquiera que sea la secuencia de operaciones de labranza (de la menos a la más intensa; es decir, de la rastra al multiarado doble+rastra) se tiene la misma cantidad de orificios de galerías. Lavelle et al. (2001) señalan que las galerías creadas por las lombrices son estructuras biogénicas de larga duración. Los resultados obtenidos en la presente tesis coinciden con esta afirmación.

Es posible que esta no-destrucción de la red de galerías por los tratamientos mecánicos aplicados se deba a dos factores que actúan simultáneamente. Por un lado, se sabe que las operaciones de labranza no modifican la porosidad del suelo en la escala de 1-5 cm (Gautronneau y Manichon, 1987), debido a que los cortes o volteos se dan en masas de suelo

de mayores dimensiones (10-50 cm) dejando inalterado el estado interno de los terrones más pequeños. Otro factor que podría contribuir a mantener inalterada la densidad de orificios es la interacción entre la arcilla y la estabilidad de las galerías creadas por las lombrices, las cuales resisten las fuerzas erosivas de la lluvia y del humedecimiento del suelo (Lavelle et al, 2001)

## **7.5 Contribución de la biología molecular al conocimiento de la macrofauna del suelo**

Los datos de secuenciación llevados a cabo indican por un lado que el organismo que habita el suelo bajo estudio es *Lumbricus terrestris*. La comparación morfológica de especímenes colectados en el sitio de trabajo con lombrices colectadas en Alemania, confirman este dato.

Por otra parte, el análisis molecular presentado en este proyecto muestra que es posible emplear iniciadores específicos para obtener secuencias del gen 16S en la identificación de lombrices. En el presente estudio se obtuvieron secuencias de 500 pb a partir de iniciadores específicos para el gen 16S con ADN molde proveniente de lombrices, resultado que concuerda con el trabajo de Pop *et al.*, (2003). Sin embargo, con el empleo de iniciadores específicos para el gen 18S se obtienen secuencias de mayor tamaño (1500 pb). Lo anterior confirma lo reportado por Erseús *et al.*, (2002). El análisis molecular es una vía que facilita la identificación de los organismos y es de gran utilidad al caracterizar una población.

## 8. CONCLUSIONES

1. La población y biomasa de lombrices no fue afectada significativamente por los tratamientos mecánicos de labranza aplicados en el presente trabajo. En cambio, dichas variables sí se vieron afectadas por la fecha de muestreo.
2. El número de orificios de galerías de lombrices en el suelo se mantuvieron estables después de la aplicación de las operaciones de labranza en los tres muestreos, indicando que los factores climáticos (lluvia y temperatura) y las presiones mecánicas aplicadas al suelo por labores de control de malezas y por la cosecha no afectaron el número de galerías creadas por las lombrices.
3. La longitud de las lombrices no fue afectada significativamente por los tratamientos.
4. Los datos morfológicos y del análisis del ADN confirmaron que la lombriz presente en las parcelas bajo estudio es *Lumbricus terrestris*.
5. Los tratamientos de labranza no provocaron cambios en las secuencias moleculares del ADN de la lombriz *Lumbricus terrestris*.
6. La humedad del suelo, la resistencia mecánica y el contenido de materia orgánica (fracciones ligera, intermedia y pesada) no se vieron afectados por los cuatro tratamientos de labranza aplicados en el presente estudio. En cambio, la humedad del suelo y la resistencia mecánica (variable dependiente de la humedad) sí fueron significativamente diferentes en las fechas de muestreo pero no entre tratamientos estudiados en la misma fecha. Las tres fracciones de MO se mantuvieron estables en las tres fechas de muestreo.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez R. y Alvarez C. 2000. Soil organic matter pools and their associations with carbon mineralization kinetics. *Soil Science Society of America Journal*. 64: 184-189.
- Amador J., Gôrres J., Savin M. 2003. Carbon and nitrogen dynamics in *Lumbricus terrestris* (L.) burrow soil: relationship to plant residues and macropores. *Soil Science Society of America* 67:1755-1762
- Anderson J. y Ingram J. 1993. *Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods*. CAB International, Wallingford. p. 220
- Azooz R. y Arshad M. 1995. Tillage effects on thermal conductivity under long-term no tillage and conventional tillage systems. *Canadian Journal of Soil Science* 76, 143–152.
- Barthelemy P., Boisgontier D., Lajoux P. 1987. Choisir les Outils de Travail du Sol. Institut Technique des Céréales et des Fourrages. ED.Agronomie inter-I.C.T.A. 29-109.
- Beauchamp K., Kathman T., McDowell R., Hedrick P. 2001. Molecular phylogeny of tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 216–224.
- Caliman J., Concaret J., Aubry M. 1990. Labor de subsoleo en una plantación de palma aceitera. Presentación del Implemento Adecuado y de las Condiciones de Realización. *Oleagineaux* 68-73.
- Carter M. 1988. Penetration Resistance to Characterize the depth and persistence of Soil loosening in Tillage *studies*. *Canadian Journal of Soil Science*. 68: 657-668.
- Cassel D. 1979. Subsoiling. *Crops and soils*. American Society of Agronomy. p. 7-10.
- Chan K. 2001. An overview of some tillage impacts on earthworm population abundance and diversity- implications for functioning in soil. *Soil and Tillage Research* 57: 179-191
- Clive E. 2004. *Earthworms Ecology*. Second Edition. ED. LLC Press pp 401-424
- Cobo J., Barrios E., Kass D., Thomas R. 2002. Decomposition and nutrient release by green manures in a tropical hillside agroecosystem. *Plant and Soil* 240: 331-342
- Compagnoni L., Putzolu G. 1995. Cría Moderna de las Lombrices y Utilización Rentable del Humus. ED. De Vecchi, S. A. p. 127
- Cotín A. 1986. Investigación de Suelos. Métodos de Laboratorio y Procedimientos para Recoger Muestras. Ed. Trillas. p.90



- DeLougherty, R.L., Crookston, R.K. 1979. Harvest index of corn affected by population density, maturity rating, and environment. *Agron J.* 71: 577-580.
- De León, F., Payán, F., Sánchez S, R. 1998. Localización de capas compactadas en el perfil del suelo mediante penetrometría. *Terra* 16 (4): 303-307.
- De León, G.F., Celada T.E., Hidalgo, C., Etchevers B.J., Gutiérrez C.M.C., Flores M.A. 2006. Root soil adhesion as affected by crop species in a volcanic sandy soil in México. *Soil and Tillage Research* 90: 77-83.
- Durán N., Ortiz R., Bruin S. 1993. Utilización de tensiómetros para la medición del status de humedad del suelo y su relación con la producción de palma aceitera. Congreso Agronómico Nacional. San José, Costa Rica p. 217.
- Duxbury J., Scott M., Doran J. 1989. Soil organic matter as a source and sink of plant nutrient. In: Coleman D, Oades M and Uehara G (Ed.) *Dynamics of Soil Organic Matter in Tropical Ecosystems*, Nifal Project, University of Hawaii. p. 33-67
- Erseús C., 2005. Phylogeny of oligochaetous Clitellata, Morphology, Molecules, Evolution and Phylogeny in Polychaeta and Related Taxa, Göteborg University, Stockholm, Sweden 535/536: 357–372
- Erseús C., Källersjö M. 2004. 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). *Zoologica Scripta* 33: 187–196.
- Erseús C., Källersjö M., Ekman M., Hovmöller R. 2002. 18S rDNA phylogeny of the Tubificidae (Clitellata) and its constituent taxa: Dismissal of the Naididae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 414–422.
- Ferruzzi C., 1994. *Manual de Lombricultura*. ED. Mundi-prensa. p. 125
- Fuentes S., Martínez F., Cancio R. 2004. Conservación, mejoramiento y fertilización de suelos. ED. Agrinfor. La Habana. 64-73
- Galeana D. M., Trinidad A. Garcia N., Flores R. 1999. Conservation tillage and fertilization in corn yield and its effects on the soil. *Terra* Vol. 17 N. 4 p 325-335.
- García M., Solano V. 2005. *Manual de Cria de Lombriz de Tierra (una Alternativa Ecológica y Rentable)*. Ed. San Pablo. 63
- Gautronneau Y., Manichon H. 1987. *Guide Méthodique du Profile Cultural CEREF/GEARA*, Paris.

- Gregorich E., Ellert B. 1993. Light fraction and macroorganic matter in mineral soils. In: Carter MR (ED) Soil Sampling and Methods of Analysis. Lewis Publishers, Boca Raton , Florida p. 397-407
- Guerif J. 1987.. L'analyse de la porosité: Application à l'étude du compactage des sols. Soil Compaction and Regeneration. Monnier, G. and Goss, M. (Editors). CEE Publ. 165 pp: 1-13.
- Hermawan B. , Cameron K. 1993. Structural changes in a silt loam under long-term conventional or minimum tillage. Soil and Tillage Research 26, 139–150.
- Herrera, H.J.G., Barreras SA. 2005. Análisis estadístico de experimentos pecuarios. Manual de procedimientos, aplicaciones del programa SAS. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. México. 213 pp.
- Hobbelen P., Colas J., Van-Gestel C. 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to Total and available metal concentrations in field soils. Environmental Pollution. Vol. 20: 1-8.
- Huerta E., Rodríguez J., Castillo E., Meneses E., Mondragón M., García R. 2005. La Diversidad de las Lombrices de Tierra (*Annelida Oligochaeta*) en el Estado de Tabasco México. Universidad y Ciencia. Vol. 21.
- Hunt D. 1986. Maquinaria Agrícola Rendimiento Económico, Costos, Operaciones, Potencia y Selección de Equipo. ED. Limusa. p. 451
- Jamieson B., Tillier S., Tillier A., Justine J., Ling E., James S., McDonald K., Hugall A. 2002. Phylogeny of the Megascolecidae and Crassiclitellata (Oligochaeta, Annelida): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. Zoosystema 24: 707–734.
- Joschko M., Fox C., Lentzsch P., Kiesel J., Hierold W., Krück S., Timmer J. 2005. Spatial Analysis of earthworms biodiversity at the regional scale. Agriculture Ecosystems and Environment. Vol. 112: 367-380.
- Katsvairo T., Cox W., Van es H. 2002. Tillage and rotation effects on soil physical characteristics. Agronomy Journal 94:299-304.
- Kimbal M. 1986. Biología a Edición. Addison Wesley. Massachusetts, USA. 772 – 782.

- Kouakoua E. 1998. La Matière organique et la stabilité structurale d'horizons de surface de sols ferrallitiques argileux. Effect du Mode de Gestion des Terres. Thesis Docteur. Universite Henri Poincaré Nancy 1. 79 pp.
- Lavelle, P., Barros, E., Blanchart, E., Brown, G., Desjardins, T., Mariani, L., Rossi, J.P. 2001. SOM management in the tropics: Why feeding the soil macrofauna?. Nutrient Cycling in Agroecosystems 61 (1-2): 53-61.
- Lee K., Pankhurst C. 1992. Soil organisms and sustainable productivity. Australian Journal of Soil Research 30, 855–892.
- Lehninger 1987. Principios de Bioquímica. Segunda edición. Omega (CD): 814-856
- López R. y López M. 1990. Diagnostico de Suelos y Plantas (Metodología de Campo y Laboratorio). ED. Mundi Prensa. p.5
- Lorenzatti S. 2005. Siembra Directa: Trigo, su impacto en la material orgánica. Industrial y Agrícola de Tucumán. EEAOC. Vol. 82, 1-2, 1-10
- Materechera, S.A., A.M. Alston, J.M. Kirby y A.R. Dexter. 1992. Influence of root diameter on the penetration of seminal roots into a compacted subsoil. Plant Soil, 144: 297-303.
- Manichon H. 1994. Observación morfológica del estado estructural y efectos de la compactación en horizontes trabajados. III Curso de Física de Suelo INTA Pergamino.1990. pp. 157 - 167
- Meijboom, F., Hassink, J., Van Noordwijk M. 1995. Density fractionation of soil macro organic matter using silica suspensions. Soil Biology and Biochemistry 27:1109-1111.
- Nylander J., Erséus C., Källersjö M. 1999. A test of monophyly of the gutless Phalloporinae (Oligochaeta, Tubificidae) and the use of a 573-bp region of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene in analysis of annelid phylogeny. Zoologica Scripta 28: 305–313.
- Olchawa E., Bzowska M., Stürzenbaum S., Morgan J., Plytycz B. 2006. Heavy Metal affect the *Coelomocyte* – bacteria balance in earthworms: Environmental Interaction between Abiotic and Biotic Stressors. Environmental Pollution No. 142. 372-381.
- Ortíz R. A. 1995. El Subsoleo en Palma Aceitera ASD Oil Palm Papers N° 10, 13-15,
- Porta J. 1986. Técnicas y experimentos en Edafología, Col·legi Oficial d'Enginyers Agrònoms de Catalunya, Barcelona, Spain. p.282

- Payán F., 2005. Effects of *Erythrina poeppigiana* pruning residues on soil organic matter in organic coffee plantations, Tesis. Tropical Agricultural Research and Higher Education Centre, (CATIE), Turrialba, Costa Rica. 9-47
- Pop A., Wink M., Pop V. 2003. Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworms taxonomy (*Oligochaeta lumbricidae*) Institute of Biological Research, Napoca-Romania, Institute for Pharmaceutical Biologie Heidelberg Germany. *Pedobiologia* 47, 428-443
- Ramasamy, K.J 2005. Vermicomposting of Taro (*Colocasia esculenta*) with two epigeic earthworm species. *Bioresource Technology*. Vol. 97: 1324-1328.
- Reeleder R., Miller J., Ball Coelho B., Roy R. 2006. Impacts of Tillage, cover crop, and nitrogen on populations of earthworms, microarthropods, and soil fungi in a cultivated fragile soil. ED. *Applied Soil Ecology*. Vol. 33: 243-257.
- Rice R. 1983. Fundamentals of no-till farming. American Association for Vocational Instructional Materials. p.148
- Rodicio M., Mendoza M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. *Enfermedades, Infecciones y Microbiología Clínica* 2004;22(4):238-45
- Rodríguez A., Fragoso C. 2002. Filogenia y Biogeografía de *Oligochaeta Octochaididae*. *Acta Zoologica Mexicana* Vol. 87. 131-171.
- Samaca E. 1999. *Ciencias Naturales 7a. Ed. Santillana*. 117, 118.
- Sánchez-Girón R. V. 1996. *Dinámica y Mecánica de Suelos*. Ediciones Agrotécnicas, S.L. Madrid. p. 426
- Schimel D. 2001. Recent patterns and mechanisms of carbon exchange by terrestrial ecosystems. *Nature* 414: 169-172.
- Schlesinger W. 1997. *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*. National Academic Press. 81-93.
- Shuster W., Subler S., McCoy E. 2002. The Influence of earthworm community structure on the distribution and movement of solutes in a chisel-tilled soil. *Applied Soil Ecology*; Vol. 21 p.159.
- Siddall M., Apakupakul K., Burreson E., Coates K., Erséus C., Källersjö M., Gelder S., Trapido-Rosenthal H., 2001. Validating Livanow: molecular data agree that leeches, branchiobdellidans and *Acanthobdella peledina* are a monophyletic group of oligochaetes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 346–351.

- Siddall M., Bureson E. 1998. Phylogeny of leeches (Hirudinea) based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 156–162.
- Silver S., Defries R. 1990. *One Earth, One Future*. Washington, National Academy Press. 3-15.
- Six J., Conant R., Paul A., Paustian K. 2002 Stabilization mechanisms of soil organic matter: implication for C-saturation of soils. *Plant and Soil* 241: 155-176.
- Thaïs W., Eptein L., Hendrix P., Horwath W. 2005. Competitive interactions between native and exotic earthworms species as influenced by habitat quality in a California grassland. *Applied Soil Ecology*. Vol. 32: 38-53
- Theng B., Tate K., Sollins P. 1989 Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: Coleman D, Oades M and Uehara G (ED) *Dynamics of Soil Organic Matter in Tropical Ecosystems*; Niftal Project, University of Hawaii. 5-31.
- Trojan M., Linden D. 1998. Macroporosity and hydraulic properties of earthworm-affected soils as influenced by tillage and residue management. *Soil Science Society of America Journal* 62, 1687–1692.
- VandenBygaart A., Fox C., Fallow D., Protz R. 2000. Estimating Earthworm-Influenced Soil Structure by Morphometric Image Analysis Soil. *Soil Science Society of America Journal*, vol. 64, May–June, 982-988.
- Vitousek P., Ehrlich P., Ehrlich A., Matson P. 1986. Human appropriation of the products of photosynthesis. *Bioscience*, 36(6): 368-373.
- Wander M., Bidart M., Aref S. 1998. Tillage impacts on depth distribution of total and particulate organic matter in three Illinois soils. *Soil Science Society of America Journal* 62, 1704–1711
- Wuest S., Caesar T., Wright S., Williams J. 2005. Organic Matter addition, N and residue burning effects on infiltration, biological, and physical properties of an intensively tilled silt-loam soil. *Soil & Tillage Research* Vol. 84; 154-167.

## ANEXOS

**Cuadro 7.** Precipitación y temperatura mensual del 2007-2008 del Estado de México.

Año	Mes	Precipitación (mm)	Temp Mensual (° C)
2007	Enero	28	11.17
2007	Febrero	23	11.685
2007	Marzo	13	13.31
2007	Abril	34	14.225
2007	Mayo	179	15.655
2007	Junio	111	15.08
2007	Julio	266	14.81
2007	Agosto	190	14.105
2007	Septiembre	155	13.88
2007	Octubre	73.5	12.16
2007	Noviembre	2	10.35
2007	Diciembre	3	10.27
2008	Enero	0	9.525

**Cuadro 8.** Número total de lombrices en los tres muestreos a una profundidad de 0 a 15 cm (promedio  $\pm$  desviación estándar)

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	11 $\pm$ 4.04	2 $\pm$ 1.15
Arado y Rastra	4 $\pm$ 2.3	6 $\pm$ 1.73	0
Multiarado y Rastra	5 $\pm$ 2.88	10 $\pm$ 3.51	3 $\pm$ 1
Multiarado Cruzado y Rastra	1 $\pm$ 0.57	23 $\pm$ 10.69	0

**Cuadro 9.** Número total de organismos obtenidos de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos en tres fechas de muestreo, a una profundidad de 16 a 30cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	26 ± 8.62	14 ± 1.52
Arado y Rastra	0	9 ± 5.19	12 ± 3.46
Multiarado y Rastra	0	12 ± 2	7 ± 1.15
Multiarado Cruzado y Rastra	0	25 ± 10.11	9 ± 2

**Cuadro 10.** Número total de organismos en estadio juvenil obtenidos de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 0 a 15cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	5 ± 2.88	1 ± 0.57
Arado y Rastra	2 ± 1.15	2 ± 1.15	0
Multiarado y Rastra	5 ± 2.88	4 ± 1.52	2 ± 0.57
Multiarado Cruzado y Rastra	0	10 ± 3.21	0

**Cuadro 11.** Número de organismos juveniles (promedios ± desviación estándar) para los cuatro tratamientos mecánicos en tres fechas de muestreo. Profundidad 16-30cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	18 ± 7.21	5 ± 1.52
Arado y Rastra	0	8 ± 4.61	5 ± 2.08
Multiarado y Rastra	0	10 ± 3.05	3 ± 0.00
Multiarado Cruzado y Rastra	0	17 ± 7.23	6 ± 2.00

**Cuadro 12.** Número de organismos en estadio adulto para los cuatro tratamientos mecánicos en tres fechas de muestreo. Profundidad de 0-15cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	6 ± 1.73	1 ± 0.57
Arado y Rastra	2 ± 1.15	4 ± 0.57	0
Multiarado y Rastra	0	6 ± 3.46	1 ± 0.57
Multiarado Cruzado y Rastra	1 ± 0.57	13 ± 7.5	0

**Cuadro 13.** Número total de organismos en estadio adulto obtenidos de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 16 a 30cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	8 ± 1.52	9 ± 0
Arado y Rastra	0	1 ± 0.57	7 ± 1.52
Multiarado y Rastra	0	2 ± 1.15	4 ± 1.15
Multiarado Cruzado y Rastra	0	8 ± 2.88	3 ± 0



**Cuadro 14.** Longitud total de organismos (promedio y desviación estándar) obtenidos de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 0 a 15cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	71.3 ± 3.72	15.5 ± 4.52
Arado y Rastra	19.2 ± 3.42	46.01 ± 4.66	0
Multiarado y Rastra	8.9 ± 1.11	78 ± 2.98	9.7 ± 1.89
Multiarado Cruzado y Rastra	6.1 ± 3.52	121.8 ± 2.64	0

**Cuadro 15.** Longitud total de organismos (¿unidades?) obtenidos de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 16 a 30cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	114.9 ± 3.15	61.7 ± 2.08
Arado y Rastra	0	24.3 ± 1.76	61.7 ± 3.15
Multiarado y Rastra	0	64.6 ± 3.52	28.5 ± 1.28
Multiarado Cruzado y Rastra	0	145.3 ± 2.34	34.1 ± 2.08

**Cuadro 16.** Biomasa total de la población de lombrices (¿Unidades?) obtenida de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 0 a 15cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	5.57 ± 0.35	0.61 ± 0.28
Arado y Rastra	1.01 ± 0.25	2.94 ± 0.35	0
Multiarado y Rastra	0.72 ± 0.18	5.23 ± 0.23	0.67 ± 0.17
Multiarado Cruzado y Rastra	0.22 ± 0.12	9.26 ± 0.32	0

**Cuadro 17.** Biomasa total de la población de lombrices (¿unidades?) obtenida de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 16 a 30cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0	6.85 ± 0.27	4.43 ± 0.20
Arado y Rastra	0	1.12 ± 0.09	4.68 ± 0.25
Multiarado y Rastra	0	3.21 ± 0.23	2.26 ± 0.18
Multiarado Cruzado y Rastra	0	9.42 ± 0.17	2.3 ± 0.06

**Cuadro 18.** Promedios de la humedad (¿unidades?) presente, obtenida de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo.

Tratamientos	16/11/07	17/01/08
Rastra	27.45 ± 4.70	16.18 ± 7.97
Arado y Rastra	23.07 ± 10.93	13.94 ± 6.45
Multiarado y Rastra	40.49 ± 3.48	14.77 ± 18.19
Multiarado Cruzado y Rastra	18.39 ± 10.92	13.55 ± 3.42

**Cuadro 19.** Promedios del número de galerías presentes, obtenida de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	28.16 ± 7.38	29.16 ± 8.38	29.5 ± 9.79
Arado y Rastra	19.58 ± 10.06	22 ± 5.49	24.58 ± 8.59
Multiarado y Rastra	25 ± 9.23	26.16 ± 10.49	31.5 ± 8.41
Multiarado Cruzado y Rastra	19.41 ± 7.68	27 ± 10.25	27 ± 8.75

**Cuadro 20.** Promedios de resistencia mecánica expresada en Megapascales (MPa) obtenidos de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 15cm

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	1.24 ± 0.49	2.25 ± 0.69	3.88 ± 4.71
Arado y Rastra	0.86 ± 0.40	2.06 ± 0.34	3.88 ± 4.71
Multiarado y Rastra	1.59 ± 0.53	2.34 ± 0.73	3.59 ± 0.66
Multiarado Cruzado y Rastra	1.17 ± 0.56	2.36 ± 0.97	3.88 ± 4.71

**Cuadro 21.** Promedios de la materia orgánica (¿unidades?) ligera presente, obtenida de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 15cm.

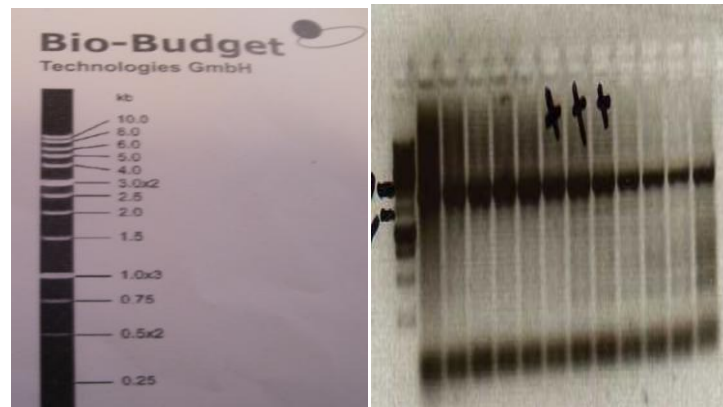
Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0.16 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.17 ± 0.13
Arado y Rastra	0.29 ± 0.34	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.03
Multiarado y Rastra	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.04	0.14 ± 0.09
Multiarado Cruzado y Rastra	0.18 ± 0.04	0.14 ± 0.002	0.13 ± 0.04

**Cuadro 22.** Promedios de la materia orgánica mediana (¿unidades?) presente, obtenida de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 15cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0.12 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.05
Arado y Rastra	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.008	0.08 ± 0.01
Multiarado y Rastra	0.10 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.08 ± 0.03
Multiarado Cruzado y Rastra	0.14 ± 0.07	0.08 ± 0.008	0.09 ± 0.04

**Cuadro 23.** Promedios de la materia orgánica pesada (¿unidades?) presente, obtenida de tres repeticiones en un diseño de bloque al azar, para los cuatro tratamientos mecánicos a lo largo de 3 periodos de tiempo, estimado a una profundidad de 15cm.

Tratamientos	19/04/07	16/11/07	17/01/08
Rastra	0.55 ± 0.12	0.39 ± 0.20	0.58 ± 0.74
Arado y Rastra	0.28 ± 0.07	0.56 ± 0.16	0.57 ± 0.47
Multiarado y Rastra	0.67 ± 0.44	0.65 ± 0.40	0.47 ± 0.45
Multiarado Cruzado y Rastra	0.52 ± 0.23	0.48 ± 0.26	0.46 ± 0.33



**Figura 16** Comparación de bandas obtenidas con el marcador de número de pares de bases del ADN.

## Secuencias

### 1-4: 18S rDNA (1818 bp)

>1 = A

TTAGCCATGCATGTCTAAGCACAAACCTTTACACGGTGAAGCTGCGAATGGCTCATTAGGCCACCCATGA  
TTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGCGGTAATTCTGGAGCTAATACATGCCACAAAGCTCC  
GACCCCTATGGGAAAGAGCGCGTTTTATTAGGTCAAACCAATCGGGTCCTCGCGGCCCGTAACTCTGATG  
ACTCTGGATAACTTCGAGCTGATCGCATGGCCTCGTGCCGGCGACGTATCTTTCAAGTGTGTGCCCTATC  
AACTTTTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGG  
AGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACA  
CGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACACTT  
TAAATCCTTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAAT  
AGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTTCGTGCCGAGCGGTTTCGCTT  
CGCGGCGGTACTTCTCGGCGCGGCCTAGCCGCCGGTCTTCGCTTGGTGCTCTTCGTTGAGTGCCTCGCGC  
GGCCGACAGATTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCGCTTCGCTTGTATAGTCGTGCATGG  
AATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAACTTGAGGTAATGATTAAGAGGGACAG  
ACGGGGGCATTTTCGTAT

>2 = B

TTAGCCATGCATGTCTAAGCACAAACCTTTACACGGTGAAGCTGCGAATGGCTCATTAGGCCACCCATGA  
TTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGCGGTAATTCTGGAGCTAATACATGCCACAAAGCTCC  
GACCCCTATGGGAAAGAGCGCGTTTTATTAGGTCAAACCAATCGGGTCCTCGCGGCCCGTAACTCTGATG  
ACTCTGGATAACTTCGAGCTGATCGCATGGCCTCGTGCCGGCGACGTATCTTTCAAGTGTGTGCCCTATC  
AACTTTTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGG  
AGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGACA  
CGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACACTT  
TAAATCCTTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAAT  
AGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTTCGTGCCGAGCGGTTTCGCTT  
CGCGGCGGTACTTCTCGGCGCGGCCTAGCCGCCGGTCTTCGCTTGGTGCTCTTCGTTGAGTGCCTCGCGC  
GGCCGACAGATTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCGCTTCGCTTGTATAGTCGTGCATGG  
AATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAACTTGAGGTAATGATTAAGAGGGACAG  
ACGGGGGCATTCGTATTACGGTGTGAGAGGTGAAATTCCTTGGAT

>3 = C

GATTAGCCATGCATGTCTAAGCACAAACCTTTACACGGTGAAGCTGCGAATGGCTCATTAGGCCACCCAT  
GATTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGCGGTAATTCTGGAGCTAATACATGCCACAAAGCT  
CCGACCCCTATGGGAAAGAGCGCGTTTTATTAGGTCAAACCAATCGGGTCCTCGCGGCCCGTAACTCTGA  
TGACTCTGGATAACTTCGAGCTGATCGCATGGCCTCGTGCCGGCGACGTATCTTTCAAGTGTGTGCCCTA  
TCAACTTTTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCC  
GGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA  
CACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACAC  
TTTAAATCCTTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCA  
ATAGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTTCGTGCCGAGCGGTTTCG  
TTCGCGGCGGTACTTCTCGGCGCGGCCTAGCCGCCGGTCTTCGCTTGGTGCTCTTCGTTGAGTGCCTCG  
GCGGCCGACAGATTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCGCTTCGCTTGTATAGTCGTGCAT  
GGAATAATGGAATAGGACCTCGGTTCTATTTTGTGGTTTTTCGGAACTTGAGGTAATGATTAAGAGGGAC

AGACGGGGGCATTCGTATTACGGTGTTCAGAGGTGAAATTCTTGGATCGCCGTAAGACGAACTACTGCGAA  
AGCATTTGCCAAGAATGTTTTTCATTAATCAG

>4 = D

ATTAAGCCATGCATGTCTAAGCACAAACCTTTACACGGTGAAGCTGCGAATGGCTCATTAGGCCACCCAT  
GATTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGCGGTAATTCTGGAGCTAATACATGCCACAAAGCT  
CCGACCCCTATGGGAAAGAGCGCGTTTATTAGGTCAAACCAATCGGGTCCCTCGCGGCCCGTAACTCTGA  
TGA CTCTGGATAACTTCGAGCTGATCGCATGGCCTCGTGCCGGCGACGTATCTTTCAAGTGTGTGCCCTA  
TCAACTTTCGATGGTACGTGATATGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCC  
GGAGAGGGAGCATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA  
CACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTACAC  
TTTAAATCCTTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGTAATTCCAGCTCCA  
ATAGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTCGGGTCGTGCCGAGCGGTT

2 --TTAGCCATGCATGTCTAAGCACAAACCTTTACACGGTGAAGCTGCGAATGGCTCATTA 58  
3 GATTAGCCATGCATGTCTAAGCACAAACCTTTACACGGTGAAGCTGCGAATGGCTCATTA 60  
1 --TTAGCCATGCATGTCTAAGCACAAACCTTTACACGGTGAAGCTGCGAATGGCTCATTA 58  
4 ATTAAGCCATGCATGTCTAAGCACAAACCTTTACACGGTGAAGCTGCGAATGGCTCATTA 60  
\* \*\*\*\*  
2 GGCCACCCATGATTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGCGGTAATTCTGGAG 118  
3 GGCCACCCATGATTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGCGGTAATTCTGGAG 120  
1 GGCCACCCATGATTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGCGGTAATTCTGGAG 118  
4 GGCCACCCATGATTTCTTAGATCGTACAATCCTACTTGGATAACTGCGGTAATTCTGGAG 120  
\*\*\*\*\*  
2 CTAATACATGCCACAAAGCTCCGACCCCTATGGGAAAGAGCGCGTTTATTAGGTCAAAAC 178  
3 CTAATACATGCCACAAAGCTCCGACCCCTATGGGAAAGAGCGCGTTTATTAGGTCAAAAC 180  
1 CTAATACATGCCACAAAGCTCCGACCCCTATGGGAAAGAGCGCGTTTATTAGGTCAAAAC 178  
4 CTAATACATGCCACAAAGCTCCGACCCCTATGGGAAAGAGCGCGTTTATTAGGTCAAAAC 180  
\*\*\*\*\*  
2 CAATCGGGTCCCTCGCGGCCGTAACCTCTGATGACTCTGGATAACTTCGAGCTGATCGCAT 238  
3 CAATCGGGTCCCTCGCGGCCGTAACCTCTGATGACTCTGGATAACTTCGAGCTGATCGCAT 240  
1 CAATCGGGTCCCTCGCGGCCGTAACCTCTGATGACTCTGGATAACTTCGAGCTGATCGCAT 238  
4 CAATCGGGTCCCTCGCGGCCGTAACCTCTGATGACTCTGGATAACTTCGAGCTGATCGCAT 240  
\*\*\*\*\*  
2 GGCTCGTGCCGGCGACGTATCTTCAAGTGTGTGCCCTATCAACTTTCGATGGTACGTG 298  
3 GGCTCGTGCCGGCGACGTATCTTCAAGTGTGTGCCCTATCAACTTTCGATGGTACGTG 300  
1 GGCTCGTGCCGGCGACGTATCTTCAAGTGTGTGCCCTATCAACTTTCGATGGTACGTG 298  
4 GGCTCGTGCCGGCGACGTATCTTCAAGTGTGTGCCCTATCAACTTTCGATGGTACGTG 300  
\*\*\*\*\*  
2 ATATGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAG 358  
3 ATATGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAG 360  
1 ATATGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAG 358  
4 ATATGCCTACCATGGTAGTAACGGGTAACGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAG 360  
\*\*\*\*\*  
2 CATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA 418  
3 CATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA 420  
1 CATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA 418  
4 CATGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGA 420  
\*\*\*\*\*  
2 CACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTGAGGCCCGTAATTGGA 478  
3 CACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTGAGGCCCGTAATTGGA 480  
1 CACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTGAGGCCCGTAATTGGA 478  
4 CACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTTGAGGCCCGTAATTGGA 480  
\*\*\*\*\*  
2 ATGAGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG 538  
3 ATGAGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG 540  
1 ATGAGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG 538  
4 ATGAGTACACTTTAAATCCTTTAACGAGGATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAG 540  
\*\*\*\*\*  
2 CCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAG 598  
3 CCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAG 600  
1 CCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAG 598  
4 CCGCGGTAATTCAGCTCCAATAGCGTATACTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAG 600  
\*\*\*\*\*  
2 TTGGATCTCGGGTCGTGCCGAGCGGTTTCGCTTCGCGGCGGTACTTCTCGGCGCGCCTAG 658  
3 TTGGATCTCGGGTCGTGCCGAGCGGTTTCGCTTCGCGGCGGTACTTCTCGGCGCGCCTAG 660  
1 TTGGATCTCGGGTCGTGCCGAGCGGTTTCGCTTCGCGGCGGTACTTCTCGGCGCGCCTAG 658

4 TTGGATCTCGGGTCGTGCCGAGCGGTT----- 627  
\*\*\*\*\*

2 CCGCCGGTCTTCGCTTGGTGCTCTTCGTTGAGTGCCTCGCGCGGCCGACAGATTTACTTT 718  
3 CCGCCGGTCTTCGCTTGGTGCTCTTCGTTGAGTGCCTCGCGCGGCCGACAGATTTACTTT 720  
1 CCGCCGGTCTTCGCTTGGTGCTCTTCGTTGAGTGCCTCGCGCGGCCGACAGATTTACTTT 718  
4 -----

2 GAAAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCGCTTCGCTTGTATAGTCGTGCATGGAATAATGG 778  
3 GAAAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCGCTTCGCTTGTATAGTCGTGCATGGAATAATGG 780  
1 GAAAAAATTAGAGTGCTCAAAGCAGGCGCTTCGCTTGTATAGTCGTGCATGGAATAATGG 778  
4 -----

2 AATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAACCTGAGGTAATGATTAAGAGGGAC 838  
3 AATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAACCTGAGGTAATGATTAAGAGGGAC 840  
1 AATAGGACCTCGGTTCTATTTTGGTTTTCGGAACCTGAGGTAATGATTAAGAGGGAC 838  
4 -----

2 AGACGGGGGCATT-CGTATTACGGTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGAT----- 884  
3 AGACGGGGGCATT-CGTATTACGGTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATCGCCGTAAGACGA 899  
1 AGACGGGGGCATTTTCGTAT----- 857  
4 -----

2 -----  
3 ACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGAATGTTTTTCATTAATCAG 941  
1 -----  
4 -----



5-8: COI (645 bp)

>5 = A

TATTCTCGGAGTTTGAGCTGGCATAAGTCCGGTATAAGACTTCTTATTTCGAATCGAGCTAAGACAG
CCGGGAGCCTTCCCTAGGCAGAGATCAACTCTACAATACAATCGTTACAGCCCACGCATTCGTAATAATTT
TCTTCTTAGTTATGCCAGTATTTATTGGCGGCTTCGGAAATTGACTTCTACCCCTAATATTTAGGCGCCCC
AGATATAGCCTTCCCACGCCTAAATAACATAAGATTTTGATTGCTACCCCTCGCTAATTCTACTAGTT
TCCTCTGCTGCGGTAGAAAATGGGGCCGGAACAGGTTGAACAGTGTATCCCCCCTAGCCAGAAATCTTG
CACATGCTGGGCCCTCAGTAGATCTAGCTATTTTTTCGCTACACTTAGCTGGAGCTTCTCT

>6 = B

AGTTTGGAGCTGGCATAAGTCCGGTATAAGACTTCTTATTTCGAATCGAGCTAAGACAGCCGGGAGCC
TTCCTAGGCAGAGATCAACTCTATAATACAATCGTTACAGCCCACGCATTCGTAATAATTTTCTTCTTAG
TTATGCCAGTATTTATTGGTGGCTTCGGAAATTGACTTCTACCCCTAATATTTAGGCGCCCCAGATATAGC
CTTCCCACGCCTAAATAACATAAGATTTTGATTGCTTCCCCCCTCGCTAATTCT

>7 = C

TCGGAGTCTGAGCCGGCATAAGTCCGGTATAAGACTTCTTATTTCGAATTGAGCTAAGACAGCCGGG
AGCCTTCCCTGGCAGAGATCAACTCTATAATACAATCGTTACAGCTCACGCATTCGTAATAATTTTCTTC
TTAGTTATGCCAGTATTTATTGGTGGCTTTGGAACTGACTCCTACCCCTAATGTTAGGCGCCCCAGACA
TAGCCTTCCACGCCTAAATAATATAAGATTTGACTGTTGCCCCCCTCGCTAATTCTTCTAGTTTCTCTC
TGCCGCTGTAGAAAAGGAGCCGGAACAGGTTGAACAGTATATCCTCCTCTAGCCAGAAATCTTGCACAT
GCTGGACCTCAGTAGACTTAGCAATTTTCTCCCTACATTTAGCAGGAGCCTCCTCCATCCTAGGGGCTA
TCAATTTTATCACGACTGTAATTAATATAACGATGAAGAGGGTTGCGACTAGAGCGAATCCCTCTATTTGT
ATGAGCCGTAGTAATTACGGTTGTTTTACTCCTCTTATCTCTACCAGTTCTTGCAGGAGCAATTACCATG
CTTTTAACAG

>8 = D

GGATAGTCCGGAGCCGGAATAAGACTCCTCATCCGAATCGAACTAAGGCAACCTGGTGCATTCCTAGGCAG
AGATCAACTTTACAATACAATGTCACTGCTCATGCATTTGTTATAATCTTCTTCTTAGTTATAACCCGTG
TTCATTGGTGGGTTTGGAACTGATTACTCCCATTAATACTTGGTGCCCCCGATATAGCATTTCCCCGCC
TAAATAATATAAGATTTTGACTACTACCTCCCTCTCTAATTCTACTAGTTTCTTCAGCAGCTGTTGAAAA
AGGAGCCGGAACCTGGTTGAACAGTATATCCCCCCTTGCAGTAATCTTGCTCATGCGGGGCCCTCAGTA
GACCTAGCTATTTTCTCCCTTCATTTAGCTGGTGCATCTTCTATTCTGGGAGCTATTAACCTTTATTACCA
CAGTAATTAACATACGATGAAAAGGACTACGATTAGAGCGAGTCCCCTTATTTGTTTGGAGCTGTGCTAAT
CACTGTAGTTCTCCTCCTTCTATCTCTCCAGTCTGGCGGGAGCAATTACAATGCTCCTCACTGATCGA
AATCTAAATACATCCTTTTTTTGATCCGGCCGGAGGGGGAGATCCTATCCTCT

2 TATTCTCGGAGTTTGAGCTGGCATAAGTCCGGTATAAGACTTCTTATTTCGAATCGA 60
6 -----AGTTTGGAGCTGGCATAAGTCCGGTATAAGACTTCTTATTTCGAATCGA 51
7 -----TCGGAGTCTGAGCCGGCATAAGTCCGGTATAAGACTTCTTATTTCGAATTGA 55
8 -----GGATAGTCCGGAGCCGGAATAAGACTCCTCATCCGAATCGA 40
\* \* \* \* \*

5 GCTAAGACAGCCGGGAGCCTTCCCTAGGCAGAGATCAACTCTACAATACAATCGTTACAGC 120
6 GCTAAGACAGCCGGGAGCCTTCCCTAGGCAGAGATCAACTCTATAATACAATCGTTACAGC 111
7 GCTAAGACAGCCGGGAGCCTTCCCTAGGCAGAGATCAACTCTATAATACAATCGTTACAGC 115
8 ACTAAGGCAACCTGGTGCATTCCTAGGCAGAGATCAACTTTACAATACAATGTCCTGTC 100
\* \* \* \* \*

5 CCACGCATTCGTAATAATTTTCTTCTTAGTTATGCCAGTATTTATTGGCGGCTTCGGAAA 180
6 CCACGCATTCGTAATAATTTTCTTCTTAGTTATGCCAGTATTTATTGGTGGCTTCGGAAA 171
7 TCACGCATTCGTAATAATTTTCTTCTTAGTTATGCCAGTATTTATTGGTGGCTTCGGAAA 175

8 TCATGCATTTGTTATAATCTTCTTCTTAGTTATAACCCGTGTTTCATTGGTGGGTTTGGAAA 160  
\*\* \*\* \*\* \*\* \* \*\* \*\* \*\* \* \*\*

5 TTGACTTCTACCCCTAATATTAGGCGCCCCAGATATAGCCTTCCCACGCCTAAATAACAT 240  
6 TTGACTTCTACCCCTAATATTAGGCGCCCCAGATATAGCCTTCCCACGCCTAAATAACAT 231  
7 CTGACTCCTACCCCTAATGTTAGGCGCCCCAGACATAGCCTTCCCACGCCTAAATAATAT 235  
8 CTGATTACTCCCATTAATACTTGGTGCCCCGATATAGCATTTCGCCGCCTAAATAATAT 220  
\*\*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\*

5 AAGATTTTGATTGCTACCCCCCTCGCTAATTCTACTAGTTTCCTCTGCTGCGGTAGAAAA 300  
6 AAGATTTTGATTGCTTCCCCCTCGCTAATTCT----- 264  
7 AAGATTCTGACTGTTGCCCCCTCGCTAATTCTTCTAGTTTCCTCTGCCGCTGTAGAAAA 295  
8 AAGATTTTGACTACTACCTCCCTCTTAATTCTACTAGTTTCCTCAGCAGCTGTTGAAAA 280  
\*\*\*\*\* \*\* \* \* \*\* \*\*\*\*\*

5 TGGGGCCGGAACAGGTTGAACAGTGTATCCCCCCTAGCCAGAAATCTTGCCACATGCTGG 360  
6 -----  
7 AGGAGCCGGAACAGGTTGAACAGTATATCCTCCTCTAGCCAGAAATCTTGCCACATGCTGG 355  
8 AGGAGCCGGAACAGGTTGAACAGTATATCCCCCCTTGCAGTAATCTTGCTCATGCGGG 340

5 GCCCTCAGTAGATCTAGCTATTTTTTCGCTACACTTAGCTGGAGCTTCTCT----- 412  
6 -----  
7 ACCTTCAGTAGACTTAGCAATTTTCTCCCTACATTTAGCAGGAGCCTCCTCCATCCTAGG 415  
8 GCCCTCAGTAGACCTAGCTATTTTCTCCCTTCATTTAGCTGGTGCATCTTCTATCTGGG 400

5 -----  
6 -----  
7 GGCTATCAATTTTATCAGACTGTAATTAATATACGATGAAGAGGGTTGCGACTAGAGCG 475  
8 AGCTATTAACTTTATTACCACAGTAATTAACATACGATGAAAAGGACTACGATTAGAGCG 460

5 -----  
6 -----  
7 AATCCCTCTATTTGTATGAGCCGTAGTAATTACGGTTGTTTTACTCCTCTTATCTCTACC 535  
8 AGTCCCCTTATTTGTTTGAGCTGTGCTAATCACTGTAGTTCTCCTCCTTCTATCTCTCC 520

5 -----  
6 -----  
7 AGTTCTTGCAGGAGCAATTACCATGCTTTTAACAG----- 570  
8 AGTCTTGGCGGGAGCAATTACAATGCTCCTCACTGATCGAAATCTAAATACATCCTTTTT 580

5 -----  
6 -----  
7 -----  
8 TGATCCGGCCGGAGGGGAGATCCTATCCTCT 612

## 9-12: 16S rDNA (475 bp)

>9 = A

GTGGGAGTATTCCTGCCAGTGACTAAGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAAT  
CACTTGCCCATTAATTGTGGGCTAGAATGAAAGGACCAACGAAATAAAGACTGTCTCTATAAGTCACTTA  
AAAATTAATCTCTAACTGAAGAGTGTTAGATCTCGTCTGAAGGACAAGAAGACCCTATAGAGCTTTATTTT  
AATAAAAAATATAAA

>10 = B

GGGAGTATTCCTGCCAGTGACTAAGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAATCA  
CTTGCCCATTAATTGTGGGCTAGAATGAAAGGACCAACGAAATAAAGACTGTCTCTATAAGCCACCTAAA  
AATTAATATCTAACTG

>11 = C

ACTAGTTCACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGCCCATTAATTGTGGGCTA  
GAATGAAAGGACTAACGAAATAAAAACTGTCTCTATAAGCCATCTAAAAATTAATCTCTAACTGAAGACT  
GTTAGATCCCGTCAAAGGACAAGAAGACCCTATAGAGCTTTATTTTAATAAAAACCATAAATTTTAAA

>12 = D

GTGAGGTATTCCTGCCAGTGACTAAGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAGGTAGCATAATC  
ACTTGCCCATTAATTGTGGGCTAGAATGAAAGGACTAACGAAATAAAAACTGTCTCTATAAACCACATAA  
AAATTAATCTCTAACTGAAGAATGCTAGATATCGTCTGAAGGACAAGAAGACCCTATAGAGCTTTATTTTA  
ACAAAAGCCA

```
9          GTGGGAGTATTCCTGCCAGTGACTAAGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAG 60
10         --GGGAGTATTCCTGCCAGTGACTAAGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAG 58
12         -GTGAGGTATTCCTGCCAGTGACTAAGTTCAACGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAG 59
11         -----ACTA-GTTCA-CGGCCGCGGTATCCTAACCGTGCAAAG 36
                    ****  *****  *****
```

```
9          GTAGCATAATCACTTGCCCATTAATTGTGGGCTAGAATGAAAGGACCAACGAAATAAAGA 120
10         GTAGCATAATCACTTGCCCATTAATTGTGGGCTAGAATGAAAGGACCAACGAAATAAAGA 118
12         GTAGCATAATCACTTGCCCATTAATTGTGGGCTAGAATGAAAGGACTAACGAAATAAAGA 119
11         GTAGCATAATCACTTGCCCATTAATTGTGGGCTAGAATGAAAGGACTAACGAAATAAAGA 96
                    *****  *****  *****
```

```
9          CTGTCTCTATAAGTCACTTAAAAATTAATCTCTAACTGAAGAGTGTTAGATCTCGTCGAA 180
10         CTGTCTCTATAAGCCACCTAAAAATTAATATCTAACTG----- 156
12         CTGTCTCTATAAACCACATAAAAAATTAATCTCTAACTGAAGAATGCTAGATATCGTCGAA 179
11         CTGTCTCTATAAGCCATCTAAAAATTAATCTCTAACTGAAGACTGTTAGATCCCGTCAA 156
                    *****  **  *****  *****
```

```
9          GGACAAGAAGACCCTATAGAGCTTTATTTTAATAAAAAATATAAA----- 225
10         -----
12         GGACAAGAAGACCCTATAGAGCTTTATTTTAACAAAAGCCA----- 220
11         GGACAAGAAGACCCTATAGAGCTTTATTTTAATAAAAACCATAAATTTTAAA 209
```