



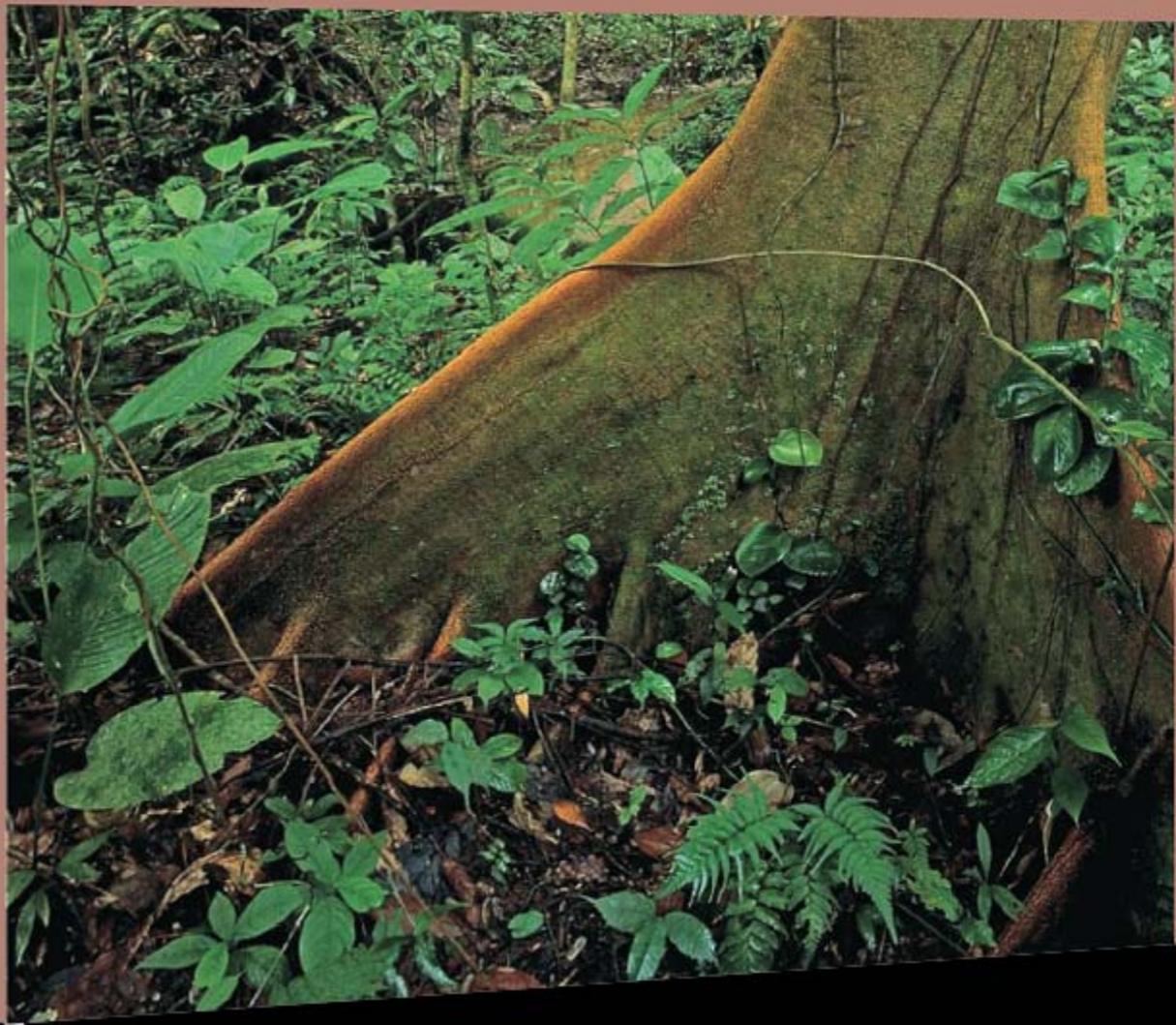
Manual de biología de suelos tropicales

Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo

Fátima M.S. Moreira, E. Jeroen Huising y
David E. Bignell (editores)

Manual de biología de suelos tropicales

Fátima M.S. Moreira, E. Jeroen Huising, y David E. Bignell (editores)



**MANUAL DE BIOLOGÍA
DE SUELOS TROPICALES**

Esta publicación presenta parte de los resultados del Proyecto Internacional "Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity", implementado en siete países tropicales: México, Brasil, Costa de Marfil, Kenia, Uganda, India e Indonesia. El proyecto es coordinado por el Tropical Soil Biology and Fertility Institute del CIAT (TSBF-CIAT) con co-financiamiento del Global Environment Facility (GEF), y con apoyo para su implementación del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA-UNEP).

Las opiniones expresadas en esta publicación pertenecen a los autores del libro y no necesariamente concuerdan con las de PNUMA-UNEP o GEF.

La traducción y publicación de este libro en español fue posible gracias al apoyo financiero del Proyecto Internacional "Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity" y al Instituto Nacional de Ecología (INE).

También queremos agradecer todas las facilidades proporcionadas por Tiberious Brian Etyang del Tropical Soil Biology and Fertility Research Area of CIAT (TSBF-CIAT) Nairobi, Kenia, a Teotonio Soares de Carvalho de la Universidade Federal de Lavras, Brazil, al Dr. José Antonio García Pérez por sus valiosos consejos y sugerencias, y a Caridad González Lerma por cuidar los últimos detalles.

Manual de biología de suelos tropicales

**Muestreo y caracterización
de la biodiversidad bajo suelo**

**Fátima M. S. Moreira, E. Jeroen Huising y
David E. Bignell (editores)**

Título original de la obra: *A Handbook of Tropical Soil Biology
Sampling and Characterization of Below-Ground Biodiversity*

© Earthscan en el Reino Unido y Estados Unidos en 2008

Hardcover ISBN: 978-1-84407-621-5

Paperback ISBN: 978-1-84407-593-5

Revisión de capítulos por especialistas en el tema:

Dra. Isabelle Barois Boullard, Instituto de Ecología, A.C.

Dra. Simoneta Negrete Yankelevich, Instituto de Ecología, A.C.

Dra. Rocío Vega Frutis, Instituto de Ecología, A.C.

M.C. José Antonio Gómez Anaya, Instituto de Ecología, A.C.

M.C. Francisco Franco Navarro, Colegio de Posgraduados

Dra. Esperanza Martínez-Romero, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dra. Lucía Varela Fregoso, Hongos y Derivados, S.A. de C.V.

Dr. Juan Rull Gabayet, Instituto de Ecología A.C.

Dra. Dora Trejo Aguilar, Universidad Veracruzana

Primera edición: 2012

D.R. © Instituto Nacional de Ecología

Periférico Sur 5000. Col. Insurgentes Cuicuilco,

Deleg. Coyoacán, 04530, México, D.F.

www.ine.gob.mx

COORDINACIÓN GENERAL DE LA PUBLICACIÓN EN ESPAÑOL: Isabelle Barois Boullard

COORDINACIÓN EDITORIAL Y FORMACIÓN: Raúl Marcó del Pont Lalli

CORRECCIÓN DE ESTILO: Adriana Victoria Arcos Méndez

REVISIÓN Y PREPARACIÓN DE ORIGINALES: Martín De Los Santos Bailón

COLABORADORA EN LA TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL: Judy Shirley

ADAPTACIÓN DEL TEXTO: Mariluz Pérez Lorenzo

DISEÑO PORTADA: Álvaro Figueroa

FOTO DE LA PORTADA: Claudio Contreras

EDICIÓN PARA INTERNET: Susana Escobar Maravillas

Forma sugerida de citar el libro: Moreira, F., E. J. Huising y D. E. Bignell. 2012. *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo*. Instituto Nacional de Ecología, México, 337 pp., México.

Ninguna parte de esta publicación, incluyendo el diseño de la portada, puede ser reproducida, traducida, almacenada o transmitida de forma alguna ni por ningún medio, ya sea electrónico, químico, mecánico, óptico, de grabación o de fotocopia sin permiso previo de los editores. Pequeños párrafos, tablas o figuras, pueden reproducirse dentro de lo estipulado en la Ley Federal de Derecho de Autor y el Convenio de Berna, o previa autorización por escrito de la editorial.

ISBN: 978-607-7908-31-9

Impreso y hecho en México

Índice

	Listado de tablas	9
	Listado de figuras	10
	Prólogo a la edición en español	13
	Prólogo	17
	Prefacio	21
	Lista de acrónimos y abreviaturas	25
1	El inventario de la biodiversidad biológica del suelo: conceptos y guía general	29
2	Diseño y estrategias de muestreo para la evaluación de la biodiversidad del suelo	53
3	Macrofauna	91
4	Collembola, acari y otra mesofauna del suelo: el método Berlese	149

5	Nematodos del suelo	163
6	Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas	177
7	Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)	217
8	Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas	243
9	Muestreo, preservación e identificación de moscas de la fruta	281
10	Hongos y nematodos entomopatógenos	287
11	Descripción y clasificación de uso de suelo en puntos de muestreo para elaborar un inventario de la biodiversidad del suelo	297
	Colaboradores	339
	Índice analítico	343

Listado de tablas

1.1	Número de especies descritas en las principales categorías taxonómicas de plantas, biota del suelo y principales grupos funcionales a los que pertenecen	26
1.2	Principales grupos funcionales de la biota del suelo	33
1.3	Niveles jerárquicos de inventario y manejo de biodiversidad bajo suelo, unidades de referencia, procesos asociados de cambio y componentes relevantes de la biodiversidad	44
2.1	Grupos de organismos del suelo colectados utilizando diferentes métodos de captura	72
3.1	Ejemplo de lista de especies	103
3.2	Densidad numérica (individuos m ⁻²) de termitas en siete localidades, a través de una gradiente de perturbación de la selva, en la provincia de Jambi del centro de Sumatra	122
4.1	Composición química para aclarar y montar especímenes	154
5.1	Composición de reactivos utilizados en la fijación de nematodos e infiltración en glicerina	167
5.2	Familias y valores cp utilizados para el índice de madurez	168
5.3	Familias y valores cp utilizados para el índice fitoparasítico	169
6.1	Filum/Orden, Familia, Género, Especie de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas	174
7.1	Esquema taxonómico propuesto para estudios de diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares y caracteres morfológicos que definen los géneros en Glomerales	210
8.1	Resumen de los métodos que utilizan clonación de DNA y secuenciación para la identificación de los haplotipos dominantes, amplificados del DNA total	253
11.1	Clasificadores y atributos técnicos para el cultivo principal	295
11.2	Tamaño del campo y características de la cobertura del cultivo	297
11.3	Atributos de cultivos combiandos	298
11.4	Características del suministro de agua	298
11.5	Factor tiempo de cultivo	299
11.6a	Clasificadores y atributos relacionados con la limpieza de la parcela, labranza y deshierbe	303
11.6b	Clasificadores y atributos para el manejo de plagas y enfermedades, fertilizantes y cosecha	307
11.7	Características de la parcela y distribución del uso de suelo	310
11.8	Características de los árboles en la finca (TROF)	312
11.9	Niveles del 1 al 5 de clasificadores y atributos para la clasificación del uso de suelo	315
11.10	Ejemplo de clasificadores y de posibles valores de atributos de una plantación de teca	318
11.11	Ejemplo de clasificadores y valores de atributos para parcelas de maíz	319

Listado de figuras

1.1	La relación entre las actividades de la comunidad biológica del suelo y gama de bienes y de servicios ambientales que puede esperar la sociedad de suelos agrícolas.	32
1.2	Principales grupos funcionales, estudiados en el proyecto CSM-BGBD, clasificados de acuerdo con dominios y reinos, tamaños y procesos de ecosistemas relacionados.	35
2.1	Diseños para estimar la relación entre biodiversidad del suelo y MOS: a) muestreo aleatorio o en cuadrícula, probablemente arrojará la mayoría de los valores de MOS cercanos a la media, dando un estimado pobre de la pendiente; b) si se incluyen de manera deliberada valores de MOS más extremos, por estratificación, esto aumentará la precisión de la estimación de la pendiente.	54
2.2	Cuatro enfoques para utilizar muestreo en cuadrícula en un paisaje con dos usos de suelo, selva y agricultura: a) una cuadrícula sencilla que incluye un parche de selva; b) tres cuadrículas que muestrean tres diferentes parches de selva; c) incrementando la replicación; d) reconociendo los límites como otra categoría.	59
2.3	Esquema de muestreo por puntos para toda la biota. El muestreo se puede ampliar si se usa uno o dos transectos para termitas, hormigas y escarabajos, mediante un muestreo casual para termitas (1 hora) y por monolitos adicionales para capturar más lombrices de tierra.	70
2.4	Esquema alternativo para muestrear macrofauna, utilizando un transecto de 50 m.	71
2.5	Ejemplos de diferentes configuraciones de ventanas de muestreo. a) cuadrícula completa, con puntos de muestreo adicionales, según se requiera; b) ilustración de la división de una cuadrícula entre seis, tres y dos ventanas, dispuestas a lo largo del gradiente.	77
2.6	Ilustración de los puntos de muestreo seleccionados mediante una cuadrícula estratificada.	81
3.1	Delimitación y excavación de un monolito pequeño (25 x 25 x 30 cm).	91
3.2	Esquema de alineación de monolitos complementarios de lombrices de tierra.	93
3.3	Separación a mano de lombrices de tierra en charolas de plástico.	94
3.4	Extracción de termitas de una muestra de suelo en una charola de aluminio.	99
3.5	Ejemplo de curva de acumulación de especies con una desviación estándar, utilizando permutaciones de datos al azar.	109
3.6	Esquema de una trampa <i>pitfall</i> con cebo.	115
3.7	Trampa <i>pitfall</i> improvisada, hecha con un vaso, cuatro palitos pequeños y una cubierta de celofán.	116
4.1	Sacabocados de metal, para muestrear la mesofauna en la hojarasca y en el suelo mineral; a) se deposita el contenido de cada núcleo en un vaso de plástico etiquetado, utilizando una pequeña cuchara o cuchillo de campo; b) se utilizan guantes como precaución contra enredaderas, hormigas, arañas y otros artrópodos.	148

4.2	a) contenedor de apoyo para embudos Berlese–Tullgren; b) sistema Berlese–Tullgren en operación.	149
4.3	Embudos Berlese llenos de suelo y hojarasca.	151
4.4	Embudo Berlese modificado, hecho de aluminio, de 50cm de altura, con embudo superior de 40 cm de diámetro.	151
4.5	Equipo básico requerido para extracciones núcleo por núcleo Berlese-Tullgren.	152
5.1	A la izquierda, juego de tamices de metal (de malla de 45 arriba y de 400 abajo), y a la derecha, suspensión de suelo en reposo.	162
5.2	a) Adición de solución de sacarosa para resuspender la mezcla de suelo y nematodos, depositada en el fondo del tubo de centrifuga b) tamizado de la suspensión de nematodos después de la flotación con sacarosa.	163
5.3	a) Nematodos recuperados mediante el lavado de malla de 400; b) muerte de nematodos en agua caliente. La rejilla que contiene a los tubos se sumerge en un recipiente con agua.	163
5.4	Remoción del exceso de agua sin perturbar el fondo de la suspensión de nematodos	165
5.5	Esquema del método de Seinhorst modificado (proceso de infiltración en glicerina) para una muestra masiva de nematodos. Las cajas Petri no deben contener más de una tercera parte de líquido.	165
5.6	Cámara de desecación con cajas Petri que contienen nematodos para infiltración en glicerina.	166
5.7	Charola con montajes permanentes de especímenes de nematodos.	166
6.1	Evaluación de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas, fijadoras de nitrógeno en diversos sistemas de uso de suelo, resumida en seis pasos.	180
6.2	Trabajo de campo: a) toma de muestras de gas del ensayo de nitrogenasa por reducción de acetileno y b) almacenaje de nódulos hasta su aislamiento en el laboratorio.	184
6.3	Producción de acetileno en campo o laboratorio.	187
6.4	Método para calcular el número más probable de células de rhizobia en el suelo mediante la técnica de infección de plantas.	189
7.1	Caja Petri con raíces teñidas para marcar la micorrización distribuida uniformemente por el método de intersección de línea.	216
10.1	Procedimiento de aislamiento de hongos entomopatógenos en medios de cultivo a) disolución seriada de la suspensión acuosa que contiene al hongo; b) inoculación de la suspensión (alícuota de 0.1 ml) en una caja Petri con medio de cultivo; c) incubación bajo condiciones controladas en una cámara DBO; d) almacenaje de conidios en tubos Eppendorf, bajo condiciones de congelación.	282
10.2	Cultivos purificados de <i>Beauveria bassiana</i> , creciendo en medio ADP.	282
10.3	Procedimiento para el uso de la trampa White para el aislamiento de nematodos entomopatógenos: a) caja Petri con papel filtro (Cámara seca); b) larvas de <i>Galeria mellonella</i> muertas después del contacto con la muestra de suelo; c) larvas que muestran la patología típica de infección por nematodos; d) emergencia de juveniles infectivos en la trampa White.	284

11.1	Disposición del uso del suelo y las clases de cobertura basadas en la presencia y ausencia de vegetación natural, y presencia o ausencia del componente arbóreo.	322
11.2.	Los cuatro cuadrantes de intensidad definidos por el nivel de mecanización y uso de agroquímicos.	324
11.3	Clasificación del uso del suelo en términos de la intensidad de uso.	325

Prólogo a la edición en español

Este prólogo es el segundo elaborado para esta misma obra y se presenta para su versión en español, por la importancia que reviste su divulgación en un idioma que puede ser leído por un amplio grupo de países de América Latina, que pueden incorporar y asimilar estos conocimientos en beneficio de la biodiversidad del suelo, la sostenibilidad y el desarrollo de sus comunidades rurales.

La biodiversidad del suelo alberga más del 25 % de la que existe en todo el planeta y, en términos generales, es la que menos se conoce. Como lo afirmó el Dr. José Sarukhán, fundador de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México, "¡Se sabe más de las estrellas que de los organismos del suelo!". El conocimiento de esta biodiversidad se ha dejado de lado durante mucho tiempo por la dificultad para abordarla, pero ahora sabemos que interviene y participa ampliamente en los servicios ambientales que brinda el suelo: por una parte, el ciclaje de nutrientes, la fijación de nitrógeno, la regulación de la dinámica de la materia orgánica del suelo, la captura de carbono y la reducción de emisiones de gases traza (CO_2 , N_2O , CH_4) son realizados principalmente por el grupo funcional de los ingenieros químicos del ecosistema, es decir, las bacterias, hongos y protozoarios y los reguladores biológicos como los ácaros, colémbolos y nematodos. Por otra parte, la elaboración de la estructura del suelo y el mantenimiento del régimen hídrico la desarrollan los ingenieros del ecosistema, que son las lombrices de tierra, hormigas, termitas, escarabajos y pequeños mamíferos. Cabe mencionar que un tipo de organismo puede participar en varios grupos funcionales.

De manera global, esta biodiversidad le da estabilidad al paisaje, permite el control de plagas y fomenta la producción de las plantas y de los animales, lo que visto desde el punto de vista antropogénico, contribuye a nuestro alimento, fibra y combustible. Y aunque es difícil cuantificar el valor económico de estos servicios, que se estiman en miles de millones de euros anuales, conocer y aprender a manejar dicha biodiversidad resulta fundamental para conservar o restaurar la fertilidad del suelo.

Mientras leemos estas líneas, las condiciones de la biota del suelo continúan alterándose aceleradamente en todo el mundo debido a las actividades humanas, pero su impacto y repercusiones sobre los procesos de funcionamiento, conservación y equilibrio del ecosistema, son grandes pero se desconocen en buena medida los mecanismos y procesos que se afectan.

Durante años los estudios del suelo fueron enfocados al conocimiento de la física y química del suelo, y se dejó de lado el estudio de la biología del suelo y, más aun, su biodiversidad. Y si bien se ha avanzado mucho al respecto, se requieren muchos años más de investigación taxonómica y funcional para comprender y manejar los procesos edáficos, así como preservar y restaurar la fertilidad natural de los suelos.

En este sentido, se reconoce la necesidad de estimular la formación de profesionales en taxonomía y sistemática de la biodiversidad del suelo, tanto del punto de vista morfométrico como molecular para lograrlo.

La pérdida de la fertilidad, combinada con las necesidades alimenticias de una población humana en continuo crecimiento, generan y provocan el avance de la frontera agrícola y la intensificación productiva; el uso de fertilizantes, pesticidas y técnicas mecánicas de cultivo modifican fuertemente las condiciones originales del suelo, reduciendo la materia orgánica contenida y alterando gravemente sus redes biológicas y funcionales, particularmente en las regiones tropicales, con repercusiones a nivel global, entendidas ahora bajo el concepto de calentamiento global.

Ante este panorama, las técnicas de muestreo y estudio de la materia orgánica y los organismos del suelo que permitan obtener información veraz, actualizada y rápida, sobre el verdadero impacto que están teniendo las prácticas de manejo, son fundamentales, pues permitirán diseñar y establecer estrategias para mantener la sustentabilidad, el equilibrio y la funcionalidad de los suelos modificados por las prácticas agrícolas, silvícolas y ganaderas en el mundo.

Este manual reúne técnicas de muestreo en campo, que han sido desarrolladas y probadas en siete países y tres continentes, particularmente en los ecosistemas tropicales, que se encuentran entre los más afectados por la deforestación y el

cambio en el uso del suelo. Esto es así porque, incluso en plantaciones agrícolas con manejo de bajo insumos, las consecuencias de un mal manejo de suelos pueden provocar consecuencias dramáticas.

Estas técnicas de muestreo básicas han demostrado ser poderosas herramientas para llevar a cabo investigación básica y aplicada, generando información útil no sólo para investigadores o especialistas sino para toda persona interesada en el estudio de la conservación y la productividad del suelo.

La información de este manual se ha organizado de acuerdo con la funcionalidad de los grupos del suelo, permitiendo llevar a cabo evaluaciones sobre la diversidad y salud del ecosistema que sirvan como base para el diseño de prácticas de manejo sustentables. Al inicio del manual se incluyen dos capítulos que ofrecen una guía para establecer un método de muestreo representativo que permita evaluar y comparar la biodiversidad del suelo en diferentes sitios, mientras que al final se encuentra un capítulo integrador que permite relacionar los inventarios de los organismos del suelo con una clasificación del uso de suelo para estimar el impacto del manejo del suelo sobre su biodiversidad.

Las técnicas y métodos de muestreo presentados en este manual no constituyen sólo una recopilación de los procedimientos originales ya conocidos, pues en este caso fueron probados, mejorados y actualizados durante el desarrollo del proyecto Conservación y manejo sostenible de la biodiversidad debajo del suelo (CMS.BGBD, por sus siglas en inglés), financiado por el GEF, Fondo para el medio ambiente, implementado por el PNUMA y ejecutado por el TSBF a nivel internacional y por el Instituto de Ecología A.C. en México.

Cabe mencionar que la mayoría de los autores que colaboraron para desarrollar este manual residen justamente en países tropicales, lo que demuestra la mayor presencia y formación de especialistas nacionales preocupados por sus recursos naturales.

La información contenida en este manual es útil para investigadores, estudiantes, profesores y profesionales involucrados en el manejo productivo de los suelos y también en su conservación. Su elaboración tiene como finalidad no sólo ser una herramienta de utilidad en el trabajo técnico, sino constituir un apoyo en el camino hacia la sustentabilidad y la relación armónica entre el hombre y la naturaleza.

Con esta versión en español, ahora este manual se encuentra disponible en tres idiomas, inglés, portugués y español, para que su alcance e impacto sea más amplio.

Agradecemos a todos los especialistas que revisaron la traducción de los textos que correspondían a su especialidad y competencia. De manera especial queremos

agradecer al Instituto Nacional de Ecología, y en particular a Raúl Marcó del Pont y su equipo, por su trabajo editorial y su paciencia ejemplar.

Isabelle Barois Boullard

COORDINADORA DE LA TRADUCCIÓN

Y DEL PROYECTO CSM-BGBD EN MÉXICO

Prólogo

Durante mucho tiempo la sociedad ha reconocido su dependencia respecto del suelo; sin embargo, sólo en tiempos recientes se ha planteado que los suelos contienen un componente biológicamente activo. Sea como fuere, los suelos en todo el mundo enfrentan una grave crisis. Ante esta situación, surge la gran necesidad de aplicar los conocimientos referentes al papel que desempeña la biodiversidad bajo suelo para su sustentabilidad. Mediante la aprobación de la Iniciativa Internacional para la Conservación y el Uso Sustentable de la Biodiversidad del suelo en la Convención sobre Biodiversidad Biológica, celebrada en el año 2006, se enfatizó la importancia de la diversidad bajo suelo y se exhortó a abrir nuevas líneas de investigación multidisciplinaria. Una línea de investigación surgida a partir de entonces es la de cómo evaluar y manejar diversidad bajo suelo en sistemas de agricultura que faciliten la productividad agrícola y sustentabilidad de suelo a largo plazo. Este manual es, sin lugar a dudas, la mejor muestra –y la más actual– para poder evaluar la biodiversidad del suelo en ecosistemas que están siendo rápidamente alterados como consecuencia de los cambios en el uso del suelo.

Un aspecto a destacar del cambio global en las regiones tropicales, es el cambio de uso de suelo asociado a la intensificación agrícola. Dicha intensificación es necesaria para asegurar el suministro global de alimentos; sin embargo, en la medida que esto ocurra, la regulación biológica del suelo se verá afectada e incluso sustituida por fertilizantes y cultivos mecánicos. Esto, a su vez, tiene como consecuencia

una reducción de la biodiversidad del suelo; problema cuya solución implica un gran reto: ¿es posible, entonces, manejar la biodiversidad del suelo para poder incrementar la productividad agrícola en regiones que están siendo degradadas? La respuesta a esta pregunta atañe a toda la humanidad porque la tierra está siendo degradada, no solamente en regiones en vías de desarrollo, sino también en países de primer mundo.

Durante mucho tiempo los ecologistas han debatido sobre la importancia de la diversidad biótica del suelo: el secuestro de carbono en suelos, la reducción de las emisiones de gas invernadero, el mantenimiento de la estructura física del suelo, la capacidad de retención de agua del mismo, la provisión de nutrientes en las plantas y el control de patógenos en plantas como contribuciones específicas de los organismos del suelo a la fertilidad de éste. Un metro cuadrado de bosque templado puede contener hasta mil especies de invertebrados y, quizás, un número mayor de diferentes tipos de microorganismos. La biodiversidad tropical ha sido subestimada y es posible que las verdaderas densidades de especies sean mayores que en otras latitudes. La relación entre la diversidad de especies y la diversidad funcional de la biota del suelo sigue siendo incierta; pero constituye uno de los principales objetos de investigación en todos los niveles, tanto en el laboratorio como en el campo. Del mismo modo, las relaciones entre la biodiversidad del suelo y la ocurrencia y magnitud de los procesos ecológicos son inciertas.

Dichos conocimientos son, desde luego, vitales para poder alcanzar la meta: productividad agrícola sustentable, así como la conservación de la biodiversidad en todo el mundo y no, únicamente, en los trópicos.

El propósito de este manual es proveer de métodos estándares internacionales para el inventario de comunidades bajo suelo y la caracterización del uso de suelo en el trópico húmedo; por lo que representa el resultado publicado de más de una década de intensa discusión y un amplio trabajo de campo por parte de un gran número de expertos investigadores de muchos países; además, cubre casi la totalidad de la gama de biodiversidad biológica, desde los invertebrados más grandes hasta las bacterias. El objeto explícito en este caso es práctico: proveer de una herramienta definitiva para establecer una línea de base y luego documentar la pérdida de biodiversidad de suelo, asociada a la deforestación y al proceso de Intensificación agrícola en los márgenes de los bosques. En última instancia, estas herramientas pueden ser utilizadas para aprovechar los organismos del suelo en el manejo de los ecosistemas, en bioprospección y para promover mejoras sustentables en la pro-

ducción agrícola, especialmente en el caso de los pueblos más pobres del mundo; no obstante, los métodos presentados en este manual contemplan también los ecosistemas terrestres en general.

Durante los últimos cincuenta años se han publicado, con cierta frecuencia, manuales metodológicos de muestreo para organismos del suelo; no obstante, el presente manual contiene notables diferencias respecto de los anteriores. Una de las más importantes es que la mayoría de los colaboradores pertenece a los países que se encuentran más afectados por la deforestación y el cambio en el uso de suelo; representan a instituciones académicas y gubernamentales en las que se requiere poner en práctica nuevas políticas para el manejo del suelo que han de ser validadas, si es que aún estamos a tiempo de parar la pérdida de la biodiversidad tropical. Inevitablemente, esto implica la reconciliación de los intereses y preocupaciones de los agricultores pobres, los objetivos nacionales de desarrollo y calidad de nuestro ambiente. En segundo lugar, los métodos han sido desarrollados y monitoreados en condiciones de campo, en doce localidades como puntos de referencia, distribuidos en siete países y tres continentes; consecuentemente, son de interés no sólo para expertos en taxonomía, sino también para biólogos en general, especialistas en agricultura y empleados técnicos de todos los niveles. En la medida de lo posible esto aplica a la identificación: las claves recomendadas son las más funcionales; también donde es necesario, se aconseja referir los especímenes a especialistas, tanto nacionales como extranjeros. Otro aspecto notable de este manual es que la biota del suelo está agrupada en ocho categorías, cada una con amplia identidad taxonómica, pero que también corresponde a un grupo funcional mayor, considerado importante o esencial en la función del suelo y, por lo tanto, a muchos servicios ambientales que los suelos proveen. El proceso responde a una necesidad selectiva, por lo que algunos taxa han sido excluidos. Tal selección es inevitable cuando se trata del suelo, porque la verdadera biodiversidad es tan amplia que queda fuera del marco de cualquier sistema científico para que se pueda documentar totalmente; sin embargo, ofrece la ventaja de traer consigo los medios para poder hacer una evaluación aproximada de la salud del suelo, dentro del alcance de la población que se encuentra relacionada con su productividad. Finalmente, los autores han incluido la revolución en metodología molecular que ha incursionado en las ciencias biológicas durante los últimos diez años. Muchas de las técnicas asociadas con una evaluación de diversidad dentro de grupos específicos microbianos han surgido a partir de

discusiones entre colaboradores y durante talleres específicamente pensados para la publicación del presente manual.

Diana H. Wall
Natural Resource Ecology Laboratory
Colorado State University
Mayo de 2008

Prefacio

Este manual es uno de los resultados del proyecto PNUMA/GEF “Conservación y Manejo Sostenible de Biodiversidad Bajo Suelo” (CSM-BGBD) que surge como respuesta a la necesidad de crear métodos estándares e instrucción práctica para el inventario de la biodiversidad bajo suelo, que permitan la comparación de resultados de inventario en áreas específicas de países tropicales con validez científica y estadística. El proyecto se inició en 2002 con el objeto de generar información y conocimientos que puedan ser utilizados para un mejor manejo y conservación de la BGBD en espacios de agricultura tropical, para mantener la productividad agrícola y reducir la extensión de la agricultura en paisajes naturales. El proyecto se lleva a cabo en México, Brasil, Costa de Marfil, Uganda, Kenia, India e Indonesia; recibe apoyo para su financiamiento del Fondo Global del Medio Ambiente (GEF por sus siglas en inglés), y para su puesta en marcha, del Programa de Naciones para el Medio Ambiente (PNUMA/UNEP). Este proyecto es ejecutado por el Instituto de Biología y Fertilidad del Suelo Tropical (TSBF), institución que pertenece al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

El manual describe métodos de muestreo y laboratorio para evaluar la biodiversidad de una gama de grupos funcionales básicos de biota de suelo; asimismo, constituye una actualización de los métodos y protocolos que fueron inicialmente propuestos por investigadores afiliados al Instituto de Biología y Fertilidad del Suelo Tropical del CIAT, a la Red de Macrofauna financiada por la Unión Europea (EU), al NERC por el Reino Unido (UK), al (TIGER), y, sobre todo, al PNUD/

UNDP-GEF con el apoyo financiero destinado al Proyecto Alternativas de Roza-Tumba-Quema (ASB). Los métodos para algunos de los grupos funcionales de organismos de suelo fueron incluidos en un manual pionero, elaborado por Anderson e Ingram (1993). Los métodos para una evaluación de biodiversidad de suelo fueron descritos en el ASB (Nota de Lectura 6B), editado por Swift y Bignell (2001), en donde también se habla del principio de grupos funcionales del inventario de organismos de suelo. Un manual formal de técnicas para organismos de suelo y organismos que viven en agua dulce y sedimentos marinos fue publicado en 1996, editado por G. S. Hall. Ésta fue la contribución, por parte de la UNESCO, al programa DIVERSITAS.

Los métodos que se describen en este manual reflejan una amplia gama de actividades del proyecto CSM-BGBD, en términos de grupos funcionales. También cubre, ampliamente, la gama completa -geográfica y biogeográfica- dentro del trópico húmedo; al igual que métodos que no han sido considerados en las publicaciones mencionadas, como es el caso de aquéllos que se refieren a la mesofauna, hongos entomopatógenos, saprófitos y patógenos y una amplia gama de artrópodos mayores; además, provee detalles adicionales en el caso de grupos funcionales específicos: como el uso de trampas *Winkler* para hormigas y trampas *Pitfalls* para escarabajos en muestras de hojarasca, o la actualización de métodos para evaluar la diversidad de nematodos, bacterias formadoras de nódulos en leguminosas (BFNFNL) y sus plantas hospederas. Los métodos estándares propuestos contienen avances tecnológicos recientes en genética molecular, tales como el registro de huellas genéticas del BFNFNL, en su caso, dentro del alcance de laboratorios nacionales.

Los métodos fueron discutidos y posteriormente perfeccionados en reuniones anuales celebradas entre los años 2002 y 2005, cuya evolución se muestra en los reportes de 2002 (Wageningen, Países Bajos), 2003 (Sumberjaya, Indonesia) y, en especial, en el de 2004 (Embu, Kenia), al igual que en varios talleres temáticos de taxonomía específica (técnicas moleculares con énfasis en T-RFLP, Cali, Colombia; octubre 2003); lombrices de tierra, Londrina, Brasil mayo/2004 y Nairobi, Kenia, diciembre 2004; HMA y Ectomycorrhiza, Bangalore, India 2005; termitas, Manaus, Brasil, agosto 2004; termitas y hormigas, Nairobi, febrero 2005; y en varios talleres llevados a cabo desde el inicio del proyecto. La definición de métodos estándares aprovecha la experiencia obtenida con la implementación de los métodos utilizados en los siete países participantes en el proyecto.

Dado que muchas especies aún son desconocidas o no se han descrito, una evaluación de la diversidad de especies resulta un proceso poco práctico. Una

mejor opción sería investigar la pérdida de grupos funcionales básicos dentro de la BGBD que muestran un cambio en el uso de suelo o una intensidad del mismo, así se podrían entender las consecuencias de una pérdida en el BGBD y, por lo tanto, interpretar esos procesos en el contexto ecológico. La hipótesis actual es que una intensificación en el uso de suelo trae consigo una reducción de la biodiversidad del suelo y a su vez, provoca una pérdida de servicios del ecosistema, en contra de una productividad sustentable; sin embargo, poco se sabe de las relaciones entre ambos factores o sobre los mecanismos por los cuales ocurren cambios en la BGBD. La conversión de uso de suelo y la intensificación de su uso, generalmente, van acompañadas por reducciones drásticas en la diversidad de plantas, que se espera, tenga implicaciones en la BGBD. Al mismo tiempo, estos cambios de uso de suelo, frecuentemente provocan una reducción de materia orgánica del suelo que forma el sustrato básico para la mayoría de los organismos que en él habitan y, por lo tanto, llega a influir sobre la abundancia y diversidad de dichos organismos. Además de estos efectos, hay otros asociados con un incremento en la intensidad del uso de suelo; esto se traduce en una alteración del suelo como hábitat, como consecuencia del labrado o del creciente uso directo de agroquímicos. Los efectos en BGBD son condiciones compuestas por el medio ambiente y por características físicas y químicas del suelo (por ejemplo: pH, nivel de nutrientes y densidad). Aun si se pudiera regresar a sus condiciones originales, dejándolo como estaba antes de ser alterado, no necesariamente se lograría restaurar la BGBD. Además, restablecer la BGBD no implica precisamente devolver los servicios del ecosistema. Quedan muchas interrogantes en cuanto al manejo de BGBD. La premisa es que la diversificación agrícola (en varios niveles) genera biodiversidad en el suelo y que la producción agrícola sustentable (en los márgenes de la selva tropical) se mejora significativamente.

La mayoría de los organismos del suelo se encuentran en los primeros 20 centímetros de su perfil, la erosión puede llegar a nulificar todos los demás procesos degenerativos, de manera que causará un impacto inmediato en la BGBD que fácilmente se antepondrá al efecto combinado de todos los factores mencionados; así, la erosión del suelo significa la más catastrófica de las alteraciones. Es por esto que el control de la erosión y la rehabilitación de suelos fuertemente erosionados deberá considerarse parte de las estrategias para conservar y sustentar un buen manejo de la BGBD.

Para responder a algunas de las preguntas mencionadas se requiere:

- Una caracterización de la biodiversidad del suelo en un amplio rango de uso de suelo de varias intensidades, desde bosque natural hasta agricultura de monocultivo, caracterizada por un cultivo continuo y un elevado uso de químicos y mecanización.
- Establecer una relación entre la biodiversidad de la superficie y bajo del suelo en los actuales y alternativos sistemas de uso de suelo, y observar cómo esta relación se modifica y se altera por las condiciones prevalecientes en el medio ambiente (incluyendo condiciones de suelo).
- Identificar “puntos de entrada” para mejorar el manejo de la tierra, mediante la introducción y/o manejo de biota de suelo (se experimenta con varios manejos alternativos). Estos “puntos de entrada” pueden incluir un mejor entendimiento del uso de prácticas indígenas, un conocimiento más amplio de prácticas existentes y un uso más efectivo de tecnologías disponibles que no requieran altos insumos.

Se espera que los métodos descritos en este manual sean útiles para el diseño y la ejecución de estudios para inventario y monitoreo de la BGBD en todos los niveles, desde una parcela (agrícola, experimental o de muestreo) hasta un paisaje natural.

Fátima M. S. Moreira, E. Jeroen Huising y David. E. Bignell

REFERENCIAS

- Anderson, J. M. e Ingram, J. S. I. (eds) (1993) *Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods*, 2nd edition, CAB International, Wallingford.
- Hall, G. S. (ed) (1996) *Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments*, CAB International, Wallingford.
- Swift, M. y Bignell, D. (eds) (2001) ‘Standard methods for the assessment of soil biodiversity and land-use practice’, International Centre for Research in Agroforestry, South East Asian Regional Research Programme, ASB Lecture Note 6B, Bogor, Indonesia, www.fao.org/ag/agl/agll/soilbiol/docs/manual-soil%20bioassessment.pdf.

Lista de acrónimos y abreviaturas

AC	Análisis de correspondencia
ADP	Agar dextrosa y papa
AFLP	Polimorfismo en el tamaño de fragmentos amplificados
AHM	Agar con harina de maíz
AM	Agar extracto de malta
ANOVA	Análisis de varianza
ARISA	Análisis automatizado del espaciador intergénico ribosomal
B	Bacteriófagos
BFNFNL	Bacterias fijadoras de nitrógeno, formadoras de nódulos en leguminosas
cPCR	Reacción en cadena de la polimerasa competitiva
CSM-BGBD	Conservación y Manejo Sustentable de Biodiversidad Bajo Suelo
BGBD	Biodiversidad Bajo Suelo
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
ea	Equivalente de ácido
EBI	European Bioinformatics Institute
ERA	Ensayo de reducción de acetileno
FID	Detector de ionización de flama
FURB	Universidade Regional de Blumenau
GEF	Global Environment Facility

GF	Grupo funcional
HMA	Hongos micorrizógenos arbusculares
ia	Ingrediente activo
ICRAF	World Agroforestry Centre
IFP	Índice fitoparasítico
IM	Índice de madurez
INPA	National Institute for Amazonian Research (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia)
ITS	Espaciadores de transcripción interna
KOH	Hidróxido de potasio
LCCS	Sistema de clasificación de cobertura de suelo
M	Micófagos
MAS	Muestreo aleatorio simple
MOS	Materia orgánica del suelo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nd	Nivel de dilución
NMP	Número más probable
P	Perturbación
Pc	Porcentaje de colonización
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Electroforesis en campos pulsados
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
PP	Parásitos de plantas
RAPD	DNA polimórfico amplificado al azar
Rep-PCR	De fragmentos repetidos palindrómicos-éxtragenicos
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
RIA	Resistencia intrínseca a los antibióticos
SR	Sensores remotos (imagen)
SSCP	Polimorfismo de conformación de cadena sencilla
TGGE	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
TRF	Fragmentos de restricción terminal
T-RFLP	Polimorfismo terminal de la longitud del fragmento de la restricción
TROF	Árboles en finca
TSBF-CIAT	Tropical Soil Biology and Fertility Institute of the International-

	Center for Tropical Agriculture
UC	Unidad de colonización
UFAM	Universidad Federal de Amazonas
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFLA	Universidad Federal de Lavras
UFMG	Universidad Federal de Minas Gerais
UnB	Universidad de Brasilia
VA	Volumen alto
VB	Volumen bajo

CAPÍTULO 1

El inventario de la biodiversidad biológica del suelo: conceptos y guía general

Mike J. Swift, David E. Bignell, Fátima M. S. Moreira y
E. Jeroen Huising

ORGANISMOS Y SERVICIOS DEL ECOSISTEMA DEL SUELO

El suelo es un hábitat que alberga una amplia gama de organismos dentro de los tres dominios taxonómicos (*sensu* Woese *et al.*, 1990) y muchos filas. La clasificación taxonómica de organismos vivos aún se encuentra en una situación polémica (Margulis y Schwartz, 1998; Cavalier-Smith, 1998, 2004), especialmente cuando se trata de los taxa a ser creados en altos niveles y los números de tales categorías altas (como reinos) a ser consideradas. Sin embargo, cualquiera que sea el sistema de clasificación utilizado, la diversidad de la biota del suelo es elevada en todos los niveles de análisis (véase Swift *et al.*, 1979; Lavelle, 1996; Brussaard *et al.*, 1997; Wall, 2004; Bardgett, 2005; Moreira *et al.*, 2006). En la Tabla 1.1 se enlistan los principales filas de organismos eucariontes y procariontes que son o pueden ser representativos en la comunidad del suelo, con más de 1.5 millones de especies de eucariontes y con una riqueza de especies estimada muy por encima de 10,000 en el caso de procariontes.

Ya que no es ni práctico ni coherente tomar en cuenta todos los organismos presentes, cuando se hace una evaluación biológica de la salud de los suelos (Lawton *et al.*, 1998), la biota (relativa a agentes no bióticos y entre ellos mismos) será evaluada por su contribución relativa a los procesos del ecosistema (*sensu* Daily, 1997; Wall, 2004). Estos procesos apoyan a los servicios del ecosistema, contri-

Tabla 1.1 Número de especies descritas en las principales categorías taxonómicas de plantas, biota del suelo y principales grupos funcionales a los que pertenecen.

Categorías taxonómicas ^a (número total de fila existentes) ejemplos de organismos de suelo/nombre común	Número de especies descritas en el taxón (todos los hábitats)	Grupo funcional ^b
Dominio Eucarionte	-	-
REINO PLANTAE [12 FILA]	255,000	-
Filum Bryophyta (musgos)	10,000	1
Filum Hepatophyta (plantas hepáticas)	6,000	1
Filum Filicinophyta (helechos)	12,000	1
Filum Cycadophyta (gimnospermas)	185	1
Filum Coniferophyta (gimnospermas)	550	1
Filum Gnetophyta	70	1
Filum Anthophyta (angiospermas)	235,000	1
Monocotiledoneas	65,000	1
Dicotiledoneas	130,000	1
REINO ANIMALIA [37 FILA]	>10 millones	-
Filum Tardigrada ^d (osos de agua)	750	2,4
Filum Mollusca ^d	99,000	-
Clase Gastropoda ^d (incluye babosas y caracoles)	35,000–40,000	2,4
Filum Annelida ^d (lombrices segmentadas)	18,000	-
Clase Polychaeta	9,000	muy raro en el suelo
Clase Oligochaeta (lombrices de tierra y Enchytraeidae)	8,800	3, 4
Clase Hirudinea (sanguijuelas)	500	4
Filum Crustacea ^d [>6 clases]	45,000	-
Clase Malacostraca ^d (incluye orden Decapoda con un esqueleto externo calcificado)	25,000	común localmente
Orden Isopoda (ácaros de la madera y cochinillas)	>11,000	5
Filum Mandibulata (Artropoda)	-	-

Tabla 1.1 *Continúa.*

Categorías taxonómicas ^a (número total de fila existentes) ejemplos de organismos de suelo/nombre común	Número de especies descritas en el taxón (todos los hábitats)	Grupo funcional ^b
Subfilum Hexapoda (Insectos)	>900,000	-
Orden Archaeognatha (pececillos de cobre ó bristetails)	350	4
Orden Thysanura	700	4,6
Orden Blattoptera (cucarachas)	4,000	4
Orden Dermaptera (tijerillas)	1,800	2, 4, 6
Orden Hemiptera (chinches)	>80,000	2, 9
Suborden Homoptera (cigarras, periquitos, afidos, pulgones, escamas)	55,000	2, 9
Suborden Heteroptera	25,000	2, 9
Orden Isoptera (termitas)	2,800	3, 4
Orden Orthoptera (saltamontes, grillos, langostas)	23,000	2, 9
Orden Thysanoptera (trips)	6,000	2, 9
Orden Coleoptera (escarabajos)	>350,000	2, 4, 6, 9
Orden Diptera (moscas, mosquitos, gegendes, mosquitos pequeños)	>125,000	2, 4, 6, 9
Orden Hymenoptera (hormigas, abejas, avispas, abejorros)	115,000	-
Familia Formicidae (hormigas)	11,826	2, 3, 6
Orden Lepidoptera (mariposas, polillas, etc.)	180,000	2,9
Orden Trichoptera	12,000	Sólo en la rivera
Orden Collembola (colémbolos)	7,500	4, 7
Orden Diplura (doble cola)	659	2, 6
Orden Protura	500	4, 7
Subfilum Myriapoda (milpiés y ciempiés)	15,162	-
Clase Diplopoda (milpiés)	10,000	4, 9
Clase Chilopoda (ciempiés)	2,500	6
Clase Symphyla	200	2, 7, 9
Clase Pauropoda	700	4, 7

Tabla 1.1 *Continúa*.

Categorías taxonómicas ^a (número total de fila existentes) ejemplos de organismos de suelo/nombre común	Número de especies descritas en el taxón (todos los hábitats)	Grupo funcional ^b
Subfilum Chelicerata ^d [3 clases]	>100,000	-
Clase Arachnida [11 órdenes]	93,455	-
Orden Palpigradi (micro-escorpiones)	80	6
Orden Acari (ácaros, garrapatas)	45,000	2, 4, 6, 7, 9
Orden Pseudoscorpionida (Pseudoescorpiones)	3,235	6
Orden Araneae (arañas)	40,000	6
Order Scorpionida (escorpiones)	2000	6
Filum Gastrotricha ^d (gastrotricha)	400	7
Filum Acanthocephala ^d (lombrices con cabeza espinuda)	1000	Parásitos artrópodos
Filum Rotífera ^d (animales de ruedas)	2000	4, 7
Filum Nemertina ^d (gusanos planos)	900	Muy raros en suelo
Filum Nematoda (nematodos, lombriz redonda, lombrices enterobius, alfilerillos)	15,000	2, 6, 7, 9
Filum Plathyheminthes ^d (Helmintos, incluidas planarias)	25,000	2,6
REINO PROTOCTISTA ^c [30 fila]	Número sin determinar	-
Filum Rhizopoda (amibas)	Número sin determinar	7
Filum Dinomastigota ^d (dinoflagelados)	4000	1,7
Filum Ciliophora (ciliados)	10,000	7
Filum Discomitochondria (flagelados y zooflagelados)	800	1, 7
Filum Diatomacea ^d (diátomos)	10,000	1
Filum Oomycota (Oomycetes)	Cientos	5, 9
Filum Rhodophyta (alga roja)	4,100	1

Tabla 1.1 *Continúa.*

Categorías taxonómicas ^a (número total de fila existentes) ejemplos de organismos de suelo/nombre común	Número de especies descritas en el taxón (todos los hábitats)	Grupo funcional ^b
Filum Chlorophyta (alga verde)	16,000	1
Reino Fungi [6 fila]	>70,000	-
Filum Microsporidia	1,500	sólo parásitos
Filum Chytridiomycota (Hongos quitridios)	1,000	5,9
Filum Zygomycota (mohos)	1,100	5
Filum Glomeromycota (hongos micorrízicos arbusculares)	204	5, 8
Filum Basidiomycota (incluidos hongos y algunas levaduras)	>22,250	5, 8
Filum Ascomycota (incluidas levaduras)	>30,000	5, 8
Dominio Archaea ^d [4 fila]	>344 ^f	10
Dominio Bacteria ^d [52 fila] ^e	>8,398 ^f	1, 5, 8, 9, 10

Nota:

a) Considerando las categorías taxonómicas, desde el más bajo hasta el más alto nivel: dominio, reino, filum, clase, orden, familia, género y especies. Procariotas (Dominio Archaea y Bacteria). Clasificación, de acuerdo con Woese *et al.* (1990). Reinos de Eucariotas clasificadas de acuerdo con Margulis y Schwartz, 1998. Hongos de acuerdo con James *et al.* (2006).

b) Grupos funcionales, de acuerdo con la Tabla 1.2 (de este capítulo).

c) Considerados por algunos autores como Protistas o Protozoos y Chromistas.

d) Incluye organismos acuáticos y del suelo.

e) Rappé y Giovannoni (2003).

f) National Center for Biotechnology Information: (www.ncbi.nlm.nih.gov., consultado el 13 de mayo de 2007), excluyendo organismos no clasificados, sin cultivo y no especificados; cuando éstos se incluyen, la riqueza correspondiente arrojará 3090 y 79.342, respectivamente.

Fuente: Moreira *et al.*, 2006.

buyendo al mantenimiento y a la productividad de los mismos, por su influencia en la calidad y salud del suelo (Hoavelle, 1996; Brussard *et al.*, 1997; Kibblewhite *et al.*, 2008). Dichos procesos pueden ser agrupados de acuerdo a cuatro funciones agregadas del ecosistema:

1. *La descomposición de materia orgánica*, que ocurre principalmente por actividad enzimática de bacterias y hongos, en gran parte realizada por animales del suelo como ácaros, milpiés, lombrices de tierra y termitas, los cuales trituran los residuos de plantas y animales, y dispersan los propágulos microbianos. Juntos, los microorganismos y los animales involucrados se llaman “descomponedores”, aunque el atributo “transformadores de hojarasca” es el más utilizado hoy en día para describirlos, siempre que no se incluya a los ingenieros del ecosistema (véase más abajo). Como resultado de la descomposición, el carbono orgánico es liberado en la atmósfera, principalmente como CO_2 o CH_4 , pero también es incorporado en diferentes reservorios en forma de materia orgánica (MOS). Estas fracciones de MOS varían en su estabilidad y longevidad, aunque en un tipo de suelo y medioambiente determinados existe un equilibrio entre el contenido del MOS y las entradas y salidas de carbono en el sistema.
2. *Ciclo de nutrientes*, estrechamente asociado con la descomposición orgánica. Aquí también los microorganismos son mediadores de la mayor parte de las transformaciones; sin embargo, el paso que marca la operación del proceso se determina mediante micropredadores, tales como protoctistas, nematodos, colémbolos y ácaros. Animales más grandes mejoran algunos procesos porque proveen nichos para un crecimiento microbiano dentro de sus intestinos o excremento. Microorganismos específicos del suelo también incrementan la cantidad y eficiencia de absorción de nutrientes por la vegetación, mediante la formación de asociaciones simbióticas como las micorrizas y la fijación de N_2 en nódulos de raíces. El ciclo de nutrientes, por la biota del suelo, es esencial para todo tipo de agricultura y silvicultura. Algunos grupos de bacterias del suelo están involucrados en transformaciones elementales autotróficas, es decir, que no dependen directamente de la materia orgánica como fuente de alimento; sin embargo, estos grupos son afectados indirectamente por factores como el contenido de agua, estabilidad del suelo, porosidad y contenido de carbono, lo que controla el resto de la biota.
3. *Bioturbación*. Las raíces de plantas, lombrices de tierra, termitas, hormigas y algunos otros de la macrofauna del suelo, se mantienen físicamente activos dentro del suelo formando canales, poros, agregados y montículos, y moviendo partículas de un horizonte a otro. Estos procesos de “bioturbación” influyen y determinan la estructura física del suelo y la distribución de materia orgánica del suelo. Así, crean y modifican microhábitats para otros organismos más pequeños y determinan propiedades del suelo como aireación, drenaje, estabilidad de agregados

y capacidad de retención de agua. A este conjunto de organismos, por lo tanto, se le ha denominado "ingenieros del ecosistema del suelo" (Stork y Eggleton, 1992; Jones *et al.*, 1994; Lavelle *et al.*, 1997). La estructura y las propiedades del suelo también están influenciadas por la producción de excretas de animales, incluyendo complejos organominerales estables durante meses o periodos más largos (Lavelle *et al.*, 1997). La bioturbación juega un importante papel en la regulación del equilibrio del agua en el suelo (infiltración, capacidad de almacenaje y drenaje) y tiene una fuerte influencia sobre la susceptibilidad a la erosión.

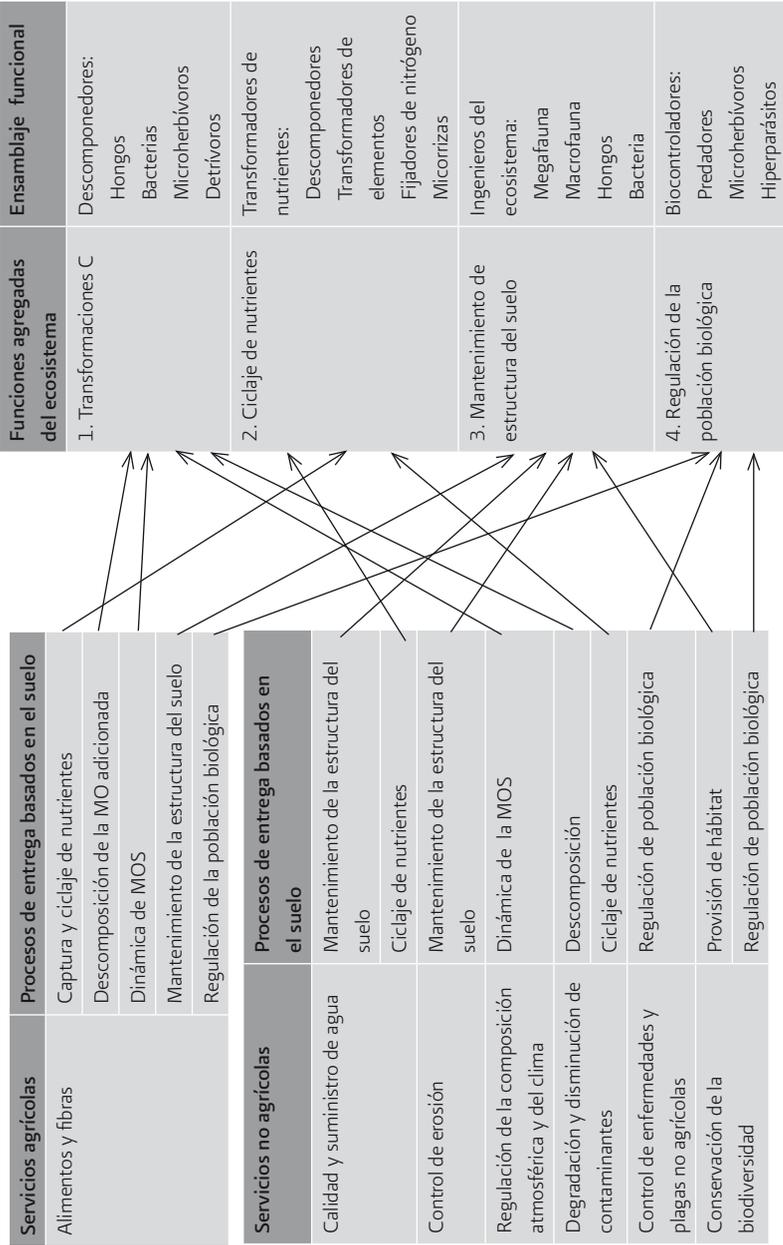
4. *Enfermedades y control de plagas.* La biota del suelo incluye un amplio rango de virus, bacterias, hongos y animales invertebrados capaces de invadir plantas y animales, y hasta humanos; y de causar enfermedades y muerte. En ecosistemas naturales, brotes intensivos de enfermedades en el suelo y plagas, son relativamente raros, pero tales epidemias sí son comunes en la agricultura. En suelos saludables, las actividades de plagas potenciales y patógenas son reguladas por interacciones con otros miembros de la biota del suelo, que incluyen microbívoros y micropredadores que se alimentan de las plagas microbianas y de animales, respectivamente, y también una amplia variedad de interacciones antagonistas microbianas. En los agroecosistemas, este rango de interacciones puede encontrarse reducido, debido a una diversidad biológica disminuida y/o en cambios ambientales del suelo, tales como los causados por un contenido de MOS más bajo.

La Figura 1.1 muestra la contribución de la biota del suelo a servicios ambientales, como resultado de los procesos anteriores. Especialmente, debe hacerse notar que la interacción entre la descomposición de materia orgánica, bioturbación y ciclo de nutrientes determinará el equilibrio entre la cantidad de carbono secuestrado en el suelo (véase arriba) y entre las emisiones de gases invernadero (principalmente CO_2 , CH_4 , NO_x , N_2O). Los organismos del suelo juegan un papel importante en la regulación de la composición atmosférica y, por tanto, en el cambio climático.

GRUPOS FUNCIONALES DE LA BIOTA DEL SUELO

En principio, todos los organismos enlistados, como miembros de la comunidad del suelo, pueden ser asignados dentro de una o más de las cuatro categorías funcionales genéricas descritas, basándose en la función particular que desempeñan o en el proceso específico del suelo del que son mediadores. Para poder interrelacionar

Figura 1.1. La relación entre las actividades de la comunidad biológica del suelo y gama de bienes y de servicios ambientales que puede esperar la sociedad de suelos agrícolas. Fuente: Kibblewhite *et al.*, 2008



organismos específicos del suelo (biodiversidad colectiva) con las categorías genéricas funcionales y, en última instancia, con los servicios del ecosistema (Setälä *et al.*, 1998) es necesario tomar en cuenta el concepto de grupos funcionales básicos, normalmente definido por criterio trófico (Brussaard, 1998) pero también calificado en función de la respuesta fisiológica, morfológica, de comportamiento bioquímico o ambiental y, de alguna manera, también de acuerdo con sus características taxonómicas.

No existe acuerdo preciso en la definición de grupos funcionales, ni de cuántos de estos grupos deberán definirse dentro de un ambiente de suelo típico, por lo tanto, el

Tabla 1.2 Principales grupos funcionales de la biota del suelo.

1. Productores primarios (plantas superiores e inferiores): organismos fotosintéticos que asimilan bióxido de carbono del aire y penetran en el suelo mediante sistemas de raíces, translocando compuestos orgánicos sintetizados arriba del suelo.
2. Herbívoros: animales que consumen y parcialmente digieren tejidos vivientes de plantas, que incluyen minadores de hojas y de tallos, y chupadores de sabia.
3. Ingenieros del ecosistema (macrofauna como termitas y lombrices de tierra): organismos que causan un impacto físico mayor en el suelo mediante su transporte, construcción de estructuras agregadas y formación de poros, incluyendo el ciclaje de nutrientes. Pueden incluir predadores; por ejemplo, muchas hormigas.
4. Transformadoras de hojarasca (muchas macrofauna y mesofauna, alguna microfauna): invertebrados que se alimentan de desechos orgánicos originados por microbios y por trituradores de este material, haciéndolo más accesible para los descomponedores o favoreciendo el crecimiento microbiano de excretas en forma de gránulos. Esta actividad puede ocurrir a varias escalas espaciales.
5. Descomponedores (hongos o bacterias degradadores de la celulosa): microorganismos que poseen las enzimas polímero-degradadoras, y que son los responsables de la mayor parte del flujo de energía en la red alimenticia de los descomponedores.
6. Predadores (muchas macrofauna y mesofauna): animales que regulan a los herbívoros, ingenieros del ecosistema, transformadores de hojarasca, descomponedores y microrreguladores por depredación.
7. Microrreguladores (microfauna como nemátodos): animales que regulan ciclos de nutrientes mediante forrajeo y otras interacciones con los microorganismos descomponedores.
8. Microsimbiontes (hongos micorrícicos, rizobia): microorganismos asociados con raíces que facilitan la absorción de nutrientes.

Tabla 1.2 Continúa.

9. Plagas y enfermedades del suelo (hongos patógenos, invertebrados, plagas) especies de control biológico también pueden incluirse (ej.: depredadores, parasitoides e hiperparásitos de plagas y enfermedades).

10. Transformadores procariontes: Archaea y bacterias que transforman de manera específica el carbono (metanotrofa) o elementos nutricionales como N, S o P (nitrificación y fijación de nitrógeno).

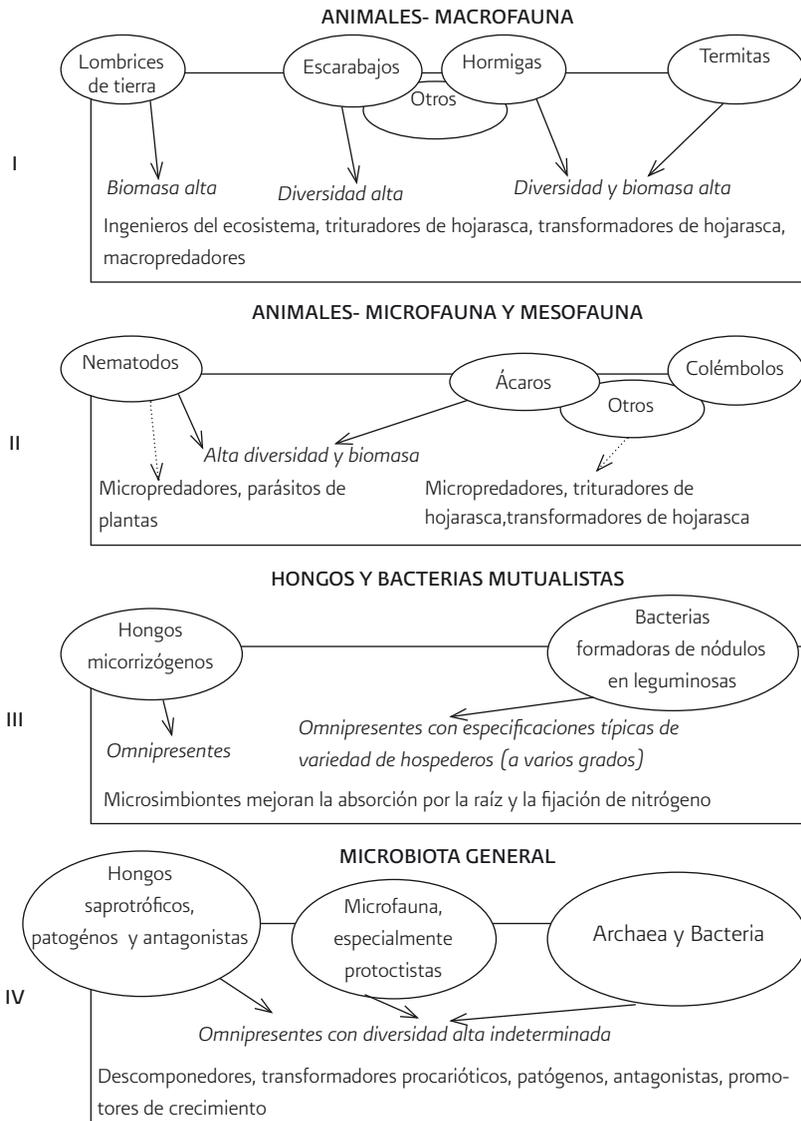
concepto es heurístico y puede modificarse en función del propósito analítico necesario; no obstante, existe un argumento válido que establece por lo menos diez categorías. Éstas están representadas formalmente en la Tabla 1.2 y se usan para anotar las categorías taxonómicas, enlistadas en la Tabla 1.1. Véase que algunos grupos funcionales incluyen una amplia gama de taxa relacionados y, a veces, no relacionados; mientras que otros son muy específicos en cuanto a su taxonomía. Por esta razón y porque muchos componentes de biota de suelo son taxonómicamente difíciles de identificar, existen pocos estudios sobre la salud del suelo agrícola, en donde el espectro taxonómico completo ha sido objeto de un muestreo representativo en el mismo lugar y al mismo tiempo (Bignell *et al.*, 2005).

GRUPOS SELECTIVOS DE BIOTA DE SUELO

En el diseño de trabajo de campo, uno de los principales desafíos es seleccionar un subgrupo de la biota del suelo que refleje adecuadamente el espectro taxonómico anticipado y que, al mismo tiempo, incluya todos los grupos funcionales considerados como importantes. La importancia funcional de cualquier especie o de grupos de especies, probablemente se relaciona con su abundancia relativa y con la biomasa; no obstante, también es importante buscar dentro de los grupos funcionales para descubrir los taxa que alcancen el criterio de ser considerados como ingenieros del ecosistema (*sensu* Jones *et al.*, 1994) y especies clave (*sensu* Davic, 2003).

Los grupos taxonómicos propuestos a continuación son seleccionados de acuerdo con su significado funcional diverso, en cuanto a la fertilidad y calidad del suelo, (razón por la cual se emplea el término "taxa seleccionado") y por su facilidad relativa a ser muestreado, aislado e identificado (Figura 1.2). Éstos son grupos taxonómicos que fueron tomados en cuenta en el proyecto *Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity (CSM-BGBD)*, cuyos métodos de inventario y caracterización se describen en los siguientes capítulos.

Figura 1.2 Principales grupos funcionales, estudiados en el proyecto CSM-BGBD, clasificados de acuerdo con dominios y reinos, tamaños y procesos de ecosistemas



Nota: la fauna se clasifica de acuerdo con el ancho de cuerpo: macrofauna >2.0 mm; mesofauna 0.1-2.0 mm; y microfauna <0.1 mm. Por su parte, nematodos y protoctistas pueden considerarse como componentes de la microbiota general, un grupo que incluye muchos organismos con papeles especiales y una diversidad de descomponedores genéricos

Además, varios de estos grupos taxonómicos son muy importantes por sí mismos como contribuidores a la diversidad biótica en general; por ejemplo, escarabajos, hormigas, lombrices de tierra, Enchytraeidae, arañas, ácaros, nematodos y, probablemente, protoctistas; todos ellos conforman un gran número de especies, al compararse con otros grupos taxonómicos superiores (Tabla 1.1). En este contexto, la distribución geográfica, la introducción de especies exóticas e invasivas, y la pérdida de especies endémicas, también representan factores de interés y preocupación.

Los grupos incluidos en la selección son:

- 1 *Macrofauna*: lombrices de tierra, que intervienen en la porosidad del suelo y en sus nutrientes, al cavar sus túneles y mediante la ingestión de materia mineral y orgánica; también actúan como reguladores de las poblaciones de biota del suelo, a escala pequeña, por ejemplo, de la mesofauna, microfauna y microsimbiontes.
- 2 *Macrofauna*: termitas, hormigas y escarabajos que intervienen en: a) la porosidad y la textura del suelo, al construir galerías y al cavar túneles e ingerir suelo; b) el ciclo de nutrientes, mediante el transporte, la trituración y digestión de materia orgánica; c) el control biológico como depredadores.
- 3 *Otra macrofauna*: cochinillas (Isópoda), milpiés (Diplópoda) y otros tipos de larvas de insectos que actúan como transformadores de hojarasca con una importante acción trituradora sobre el tejido de plantas muertas y sus depredadores (ciempiés, arácnidos grandes y otros tipos de insectos). Algunas especies también resultan perjudiciales porque se convierten en plaga.
- 4 *Mesofauna*: colémbolos y ácaros que actúan como transformadores de hojarasca y micropredadores (forrajeros de hongos, bacterias y depredadores de otros animales del suelo), de esta manera contribuyen en procesos orgánicos de trituración a pequeña escala y ejercen un importante papel regulatorio dentro de la biota del suelo. Algunas especies de ácaros y formas de larvas de muchos artrópodos de suelo son lo suficientemente pequeñas como para clasificarse dentro de la microfauna.
- 5 *Microfauna*: nematodos y protoctistas que, a) influyen en la tasa de recambio por su papel como forrajeros de raíces (parásitos de plantas), micófagos, bacteriófagos, omnívoros y depredadores, b) ocupan espacios que existen en pequeños poros, en los que viven dependientes de películas de agua, c) normalmente representan una riqueza genérica y de especies muy alta d) juegan un papel importante en la regulación de abundancia y actividad microbiana, e)

como insectos patógenos, representan un importante control biológico.

- 6 *Hongos micorrizógenos arbusculares*: se asocian con las raíces de las plantas y mejoran la disponibilidad de nutrientes; de esta manera, reducen ataques patógenos en plantas y mejoran la tolerancia al estrés del medio ambiente.
- 7 *Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas* y, en ocasiones, otros fijadores de nitrógeno microsimbiontes que transforman el nitrógeno atmosférico N_2 en NH_3 , que es asimilable para las plantas.
- 8 *Hongos fitopatógenos, saprotrofos y antagonistas*: que determinan o median (en diferentes casos) la viabilidad de cultivos, rotación de carbono orgánico en descomposición, y enfermedades de las plantas, y contribuyen al potencial control biológico de plagas y enfermedades.

MÉTODOS PARA INVENTARIO DE LA BIODIVERSIDAD BAJO SUELO: PRINCIPIOS GENERALES

La metodología actual no permite la identificación de todas las especies en el suelo. En muchos Fila, la mayoría de las especies aún son desconocidas. En la biota del suelo, el concepto de especies también es muy variable; por ejemplo, entre bacterias, hongos y animales invertebrados. En los casos de Archaea y bacteria, la caracterización molecular y bioquímica reemplaza al enfoque de identificación tradicional.

Los métodos empleados para la extracción de diferentes grupos de organismos del suelo también son muy diferentes de un grupo a otro. Estos factores, aunados a la inmensa escala de diversidad encontrada en el suelo, requieren de un enfoque selectivo para llevar a cabo un inventario de la biodiversidad bajo suelo, utilizando el concepto de grupos funcionales clave como los descritos anteriormente.

Aún sigue siendo una pregunta sin respuesta la relación existente entre diversidad de especies, diversidad funcional (el número de grupos funcionales), composición funcional (la naturaleza de los grupos funcionales) y ocurrencia e intensidad de los procesos ecológicos. Se espera que los servicios de ecosistema, que dependen de grupos funcionales, compuestos por relativamente pocas especies y/o especies altamente especializadas, sean los más vulnerables ante situaciones de estrés y perturbación que afectan a dichos grupos funcionales. Hasta donde se conoce, lo anterior aplica para los trituradores de materia orgánica (véase transformadores de hojarasca en Tabla 1.2), bacterias que nitrifican y desnitrifican (como parte de los transformadores procariontes), bacterias involucradas con el compuesto

C1 y en las transformaciones de hidrógeno (metanogénicas y metilotróficas), hierro, cobre y azufre quimiolitotrofos, hongos micorrizogenos (entre los microsimbiontes) y bioturbadores (ingenieros del ecosistema); esto conlleva a una serie de interrogantes como ¿cuál es el número mínimo de especies dentro de los grupos funcionales que garanticen la resistencia del suelo contra el estrés del ecosistema natural y antropogénico, y en relación con que “especies clave (si existen) en los grupos funcionales?”. Por lo tanto, cuando se adopta el concepto de los grupos funcionales principales, preguntas como las anteriores deberían ser consideradas en la definición del propósito del objetivo de la investigación de la biodiversidad bajo suelo, puesto que se reflejarán en los métodos a utilizarse.

Los métodos estándar son necesarios para describir los ecosistemas de manera consistente. Este manual aborda métodos para el inventario y caracterización de la biodiversidad del suelo, centrándose en los grupos funcionales que permitan la evaluación de la diversidad, abundancia y composición de las especies. La evaluación de la composición de la comunidad biótica depende de la identificación de los especímenes recolectados, lo que exige un alto nivel de conocimientos taxonómicos, que para algunos grupos y en algunos países es un desafío importante. En este manual no se abordan problemas taxonómicos, aunque se dan referencias de claves para la identificación de especies de varios grupos funcionales.

Los métodos han sido desarrollados, escogidos y modificados, especialmente, para su aplicación en paisajes con diferentes usos de suelo, de manera que sea posible evaluar, por ejemplo, el impacto que provoca la intensificación agrícola, la fragmentación de hábitat y el manejo de cultivos en la diversidad biológica del suelo. Esto debería servir como respuesta a un gran número de preguntas en contextos similares. En el prefacio se plantea una breve descripción del proyecto, para el cual se han desarrollado y probado los métodos.

INVENTARIO DE BIODIVERSIDAD BAJO SUELO EN ESCALAS DE ESPACIO Y TIEMPO

Cambio de uso de suelo como la causa principal del cambio de diversidad biológica del suelo

Un inventario puede demostrar si la biota del suelo responde a intervenciones humanas como prácticas agrícolas, deforestación, contaminación y cambio climático. Si éste es el caso, las consecuencias pueden ser negativas, en términos de una dis-

minución de los servicios del ecosistema; incluso puede producirse la pérdida de la productividad primaria, debido a cambios en la fertilidad del suelo y/o incrementos de enfermedades en el mismo; pérdida del potencial para la limpieza de los residuos y contaminantes, interrupción de los ciclos elementales globales y respuesta ante los efectos de los gases invernadero y de la erosión. El suministro global de alimentos depende de la agricultura intensiva; en la medida que proceda la intensificación, la biodiversidad arriba del suelo se verá reducida, lo cual implica una reducción de la biodiversidad bajo suelo y, por ende, la regulación biológica de los servicios de ecosistema basados en el suelo. Dichas funciones regulatorias frecuentemente se describen como “sustitutos” por insumos, tales como cultivo mecánico, fertilizantes químicos y pesticidas (Kibblewhite *et al.*, 2008). Se presume que de esa forma se reducirá la diversidad bajo suelo y que, si se acompaña de la extinción de especies individuales, puede causar pérdidas de función y reducir la habilidad de los sistemas agrícolas para soportar periodos inesperados de estrés, produciendo efectos indeseables. En los trópicos, un gran número de agricultores tienen acceso limitado a insumos; a pesar de que la producción se ha intensificado, la complejidad de los agroecosistemas ha sido drásticamente reducida. Una solución alternativa sería intensificar y, al mismo tiempo, retener una buena cantidad de diversidad sobre el suelo. El mantenimiento de una variedad de cultivos y otras plantas es aceptado como una práctica que protege al agricultor contra los riesgos a corto plazo, además, la biodiversidad y complejidad arriba del suelo favorecen el restablecimiento o protección de la diversidad de organismos bajo suelo; especialmente, de los que puedan realizar las funciones biológicas esenciales. Este hecho puede considerarse tanto a nivel de campo como de paisaje, para mejorar la complejidad estructural y diversidad funcional, especialmente en suelos degradados.

Para qué muestrear, dónde y cuándo

Aunque éste es un manual de instrucción práctica, en la medida de lo posible, debería reflejar un consenso de la teoría ecológica y del pensamiento actual sobre estructuras de la comunidad en diferentes escalas espaciales y temporales, escalas que determinan la predicción de servicios ecosistémicos. Sin embargo, los procesos de disturbio -y recuperación- que afectan la biodiversidad bajo suelo, también se manifiestan en diferentes escalas espaciales y temporales (por ejemplo, varias frecuencias), muchas veces enlazadas entre sí. El principio central es que el significado funcional de la diversidad biológica cambia de acuerdo con las escalas de

espacio y tiempo (Swift *et al.*, 2002; Lavelle *et al.*, 2004). En términos generales, esto quiere decir qué se mide, dónde y cuándo se mide, tomando en cuenta los aspectos de la biodiversidad que puedan afectar, de manera general, a los servicios del ecosistema en diferentes tipos de comparaciones.

El objetivo debería ser reducir la variabilidad intragrupo y maximizar la variabilidad entre grupos. El mayor reto, entonces, es cómo definir estos “grupos” en relación con niveles de escala, espaciales y temporales, con el propósito de lograr lo anterior. Por ejemplo, se puede esperar una variación grande, en número y diversidad de lombrices de tierra al moverse de un lugar a otro; o bien, del campo hacia setos que delimitan el terreno, mientras que en el caso de la zona de uso de suelo, que combina estos elementos dentro de un sistema de uso de suelo, los números o diversidad pueden mantenerse estables. Esto quiere decir que, el inventario de especies de lombrices de tierra, en un lugar específico, puede quedarse corto en relación con el propósito de evaluación de la diversidad de toda el área, como se podría esperar, si el objetivo del inventario es conservar la biodiversidad bajo suelo. De la misma manera, la diferencia que puede ocurrir en la descomposición o la fijación de nitrógeno simbiótico entre dos paladas de suelo del mismo campo, probablemente es cuestión de saber cuáles microorganismos existen en cada una; pero en el caso de dos campos colindantes, en un mismo paisaje, puede que se deba al drenaje o manejo previo del lugar, o bien, a la existencia de termitas o cualquier otro ingeniero del ecosistema que haya presentado mayor actividad en un lugar que en otro.

Entre dos paisajes o dos regiones, se pensaría que el material parental y el clima fueran los factores determinantes en el proceso de formación del suelo. La formación del suelo, a escala regional, constituye uno de los servicios del ecosistema que integra procesos en todas las escalas. El clima, los materiales parentales y los suelos serán los principales determinantes de todos los servicios del ecosistema a nivel paisaje; no obstante, puede haber una influencia biótica significativa, si uno o más grupos funcionales importantes estuvieran ausentes o permanecieran en baja presencia en una de las localidades o si el ecosistema original de bosque se hubiera reducido a una presencia mínima en uno de los lugares, mientras se mantuviera en un paisaje mixto, en otro lugar.

Las escalas temporales son importantes en los procesos de degradación, por ejemplo, la pérdida progresiva de macroporos, la erosión de finas partículas de suelo y la reducción al mínimo de materia orgánica compleja que, en última instancia podría, incluso, destruir la capacidad productiva, al punto de llegar a hacerla ser irre recuperable. Asimismo, en caso de rehabilitación, los ciclos de vida de diferentes

taxa de biota varían de horas a años y pueden incorporar estados obligados de inactividad, mientras que las fecundidades también varían y, por lo tanto, el tiempo requerido para que una población creciente alcance un tamaño crítico mínimo donde es autosuficiente, también será diferente de un organismo a otro. Los principales conceptos teóricos que corresponden a estos criterios son: apertura y conectividad, ampliamente discutidos, en el caso del ecosistema de suelo y sedimentos (Wall, 2004). El impacto en el diseño de muestreo, al igual que en los protocolos de medición, se enfatiza en el capítulo 2 de este manual.

Los cuatro niveles de escala espacial en muestreo, como se indica más adelante, son usados en el proyecto CSM-BGBD (véase prefacio) y están considerados como ejemplo. No obstante, cada proyecto necesitará determinar su propia escala en función de sus objetivos. La Tabla 1.3 muestra un resumen de niveles jerárquicos modificados a partir de los propuestos por Lavelle *et al.* (2006), al igual que los procesos de cambio relacionados, que afectan a la biodiversidad bajo suelo (y servicios ambientales asociados) y el componente de la biodiversidad bajo suelo, de gran relevancia en ese nivel.

1. *Paisaje*. En el nivel más alto, la distribución espacial de la biodiversidad bajo suelo estará fuertemente influenciada por los gradientes de altitud y temperatura, por los gradientes o transiciones de las condiciones de humedad o por los gradientes de las propiedades del suelo, derivados de la base mineral y vegetal. El patrón de uso de suelo superpuesto en función de dichos efectos de clima, geología, vegetación y tipo de suelo, será un determinante más de dicho nivel. Las características espaciales de la distribución de uso de suelo (“parches” de uso de suelo, como puede ser dentro de los bosques), también tendrán una importante influencia en la biodiversidad. El inventario de biodiversidad bajo suelo, a escala de paisaje, deberá capturar la distribución, tamaño y forma de estos gradientes y fragmentaciones, para explicar las posibles variaciones en la biodiversidad bajo suelo.

A nivel paisaje es difícil evaluar el efecto de la biodiversidad bajo suelo sobre algunos servicios del ecosistema, como calidad y suministro de agua o control de erosión y no parece que éste juegue un papel importante, comparado con los efectos que produce la vegetación misma. La biodiversidad bajo suelo, incluyendo el descubrimiento de especies invasivas exóticas es, en este caso, más útil como indicador de la respuesta del suelo al manejo. La protección y conservación de los principales agroecosistemas y hábitats representa la mejor

opción para dicha intervención. La escala de tiempo de estos procesos (cambio de la composición de uso de suelo y configuración de paisaje) para ser observable necesitaría de varios o, incluso, de cientos de años.

2. *Área de uso de suelo.* Las áreas de uso de suelo se definen en función de su uso y régimen de manejo (Huising, 1993), tal es el caso de un área con plantaciones comerciales de té o la caracterizada por la agricultura de autoconsumo. Estas áreas muestran, típicamente, una combinación específica de tipos de cobertura. La biodiversidad sobre el suelo se determina por la variedad de cultivos encontrados en el área y por los elementos vegetales asociados con barbechos, rompevientos, cercos vivos, tramos de bosque y otros elementos de manejo de paisajes. Las interacciones laterales son componentes muy importantes para la biodiversidad bajo suelo, y para la manera en cómo funciona el sistema, sobre todo, cuando se trata de agrosilvicultura. Los gradientes de las propiedades de suelo sí ocurren en este nivel, pero son asociados con el manejo; por ejemplo, Vanlauwe *et al.*, 2006 y Tiftonell *et al.*, 2007, describen los gradientes de la fertilidad del suelo en función de los recursos destinados al terreno, por lo tanto, es en este nivel donde la biodiversidad bajo suelo debería estudiarse de manera minuciosa, respecto al cambio de uso de suelo. La intensificación de uso de suelo, normalmente, se asocia con la extracción de elementos vegetales como árboles, que implican una pérdida de sus aportes e impactos; éste es el caso de algunos árboles donde ciertos organismos de suelo hacen uso de sus nichos, de manera que la relación entre el patrón de distribución espacial de la biota sobre el suelo con la de bajo suelo son particularmente interesantes. En este nivel, los cambios relacionados con el uso y cobertura del suelo, son visibles en escalas de tiempo más cortas que pueden abarcar desde pocos años hasta varias décadas.
3. *Parcela o parche.* A nivel de parcela, la composición y actividades funcionales de la biota son de gran interés y, en el caso del inventario de biodiversidad bajo suelo, también lo es la abundancia de especies relativas, pertenecientes a varios niveles tróficos y grupos funcionales que gobiernan la estabilidad de redes alimenticias y la provisión de funciones de apoyo. A este nivel, la estructura comunitaria y sus interacciones son reguladas por la arquitectura del suelo del lugar en específico (Lavelle *et al.*, 2006). El terreno o parche, si no es demasiado grande, queda dentro de los dominios funcionales de los ingenieros del ecosistema, incluyendo a las raíces de suelo. Cambios en la arquitectura del suelo, aunque sean provocados por cambios en la composición funcional y actividad de los ingenieros del ecosistema o del arado del suelo, tendrán un

efecto sobre las interacciones tróficas y, por lo tanto, en la estructura de la red alimenticia. El manejo de materia orgánica y el uso de agroquímicos causarán un mayor impacto en la estructura de la red alimenticia.

Cualquier tipo de inoculación causará un impacto directo sobre la diversidad bajo suelo y, por ende, puede servir para corregir desequilibrios en la composición funcional o para mejorar algunas funciones en particular, como en la cadena alimenticia, la introducción de depredadores para el control de una enfermedad en particular. Tal intervención debería apoyarse en el inventario y la abundancia relativa de especies, pertenecientes a grupos funcionales definidos o a niveles tróficos dentro de la cadena alimenticia. A nivel parcela, los procesos involucrados, condicionados por los organismos de suelo en la producción de servicios de apoyo tales como mantenimiento de la estructura de suelo y la descomposición de materia orgánica introducida, tienen escalas de tiempo relativamente cortas y mostrarán variaciones estacionales. Cambios estructurales en la comunidad biótica (conexiones en la cadena alimenticia, composición funcional) pueden necesitar de varios años.

4. *Nicho, subparcela o microhabitat.* Este nivel se refiere a los microhábitats que alojan a los microbios y a los componentes de la microfauna del sistema de suelo que los regulan. Éstos existen en la escala de los horizontes de suelo, del agregado individual y de la partícula individual, son segregados en los dominios funcionales: rizósferas, drilósferas, termitósferas, etc., reflejándose la dependencia de los organismos más pequeños en los ingenieros del suelo para el suministro de sus sustratos (véase Lavelle y Spain, 2001, para mayores detalles y terminología). La redundancia funcional entre los transformadores primarios (especies o familias diferentes que cumplen una misma función), la competencia y la eficiencia son de particular relevancia y, en relación con esto, el grado de diversidad genética, dentro de los microorganismos, también despiertan gran interés. Las opciones para intervenciones de manejo en una escala de subparcela son actualmente limitadas, principalmente, la inoculación con especies microbianas, pero un entendimiento de los procesos e interacciones es vital, dado que ésta es la unidad fundamental de la función del suelo.

Las "intervenciones" enlistadas en la Tabla 1.3 son parcialmente derivadas del concepto "el manejo jerárquico de la biota del suelo", según lo describe Swift (1998). La lista de intervenciones y mediciones correspondiente a la biodiversidad bajo suelo, no es necesariamente exhaustiva, sino más bien ilustrativa,

existiendo una superposición entre niveles de escala dentro de los parámetros a medir.

Tabla 1.3 Niveles jerárquicos de inventario y manejo de biodiversidad bajo suelo, unidades de referencia, procesos asociados de cambio y componentes relevantes de la biodiversidad.

Capa de nivel de agregación	Tipo de unidad	Número de clases o unidades	Proceso/ intervención	Medida/ parámetro de biodiversidad
Paisaje	Área caracterizada por un mosaico de uso de suelo y de ecosistemas como cuenca mayor.	Sin especificar: tal vez, varias por bioma o por región dentro de un país.	Cambio de uso de suelo: protección de usos de suelo y elementos de paisaje, de relevancia específica para la biodiversidad y mantenimiento de la provisión de servicios de ecosistema, por ejemplo, parches de selva, corredores biológicos.	Diversidad biológica de suelo: especies exóticas e invasoras.
Área de uso de suelo	Área con uso de suelo característico y patrón de cobertura de suelo y régimen de manejo.	3–20 tipos de áreas de uso de suelo, dentro de un paisaje específico (dependiente del nivel de detalle de la clasificación).	Intensificación de uso de suelo, degradación de suelo; mantenimiento de áreas de refugio biológicas y biodiversidad arriba del suelo; manejo integrado de recursos naturales y prácticas de conservación del suelo.	Diversidad funcional, diversidad y composición de especies especialmente relacionada con ingenieros de ecosistemas: patrón de distribución espacial.

Tabla 1.3 *Continúa.*

Capa de nivel de agregación	Tipo de unidad	Número de clases o unidades	Proceso/ intervención	Medida/ parámetro de biodiversidad
Parcela, parche	Área con un uso particular y manejo particular; por ejemplo, campo agrícola, parcelas de vegetación, selva, etc.	10 a 100 por área de uso de suelo.	Intensificación de manejo de suelo y cultivos, erosión, mejoramiento de sistemas de cultivo y manejo de materia orgánica, labranza mínima, etc. inoculación.	Abundancia relativa de especies, dentro y entre grupos funcionales y niveles tróficos; composición funcional.
Nicho microhábitat	Por ejemplo, horizontes de suelo, rizósfera, drilósfera.		Manejo de biota clave; introducción de agentes de control biológico, inoculación con microsimbiontes.	Biomasa y actividad microbiana, diversidad genética.

Datos requeridos

Los métodos expuestos en este manual, proveen un gran número de parámetros para la evaluación de la biodiversidad bajo suelo. Sin tomar en cuenta los objetivos específicos y el diseño experimental de cualquier estudio, los datos tendrán que ser acumulados en cada punto de muestreo, para lo cual se indican en los capítulos 3 y 9 los mejores métodos, que consisten en el uso oportuno de tiempo y recursos. Por regla general, el inventario bajo suelo de la biodiversidad, utilizando los métodos previstos en este manual, provee los siguientes datos e información, dependiendo del tipo de análisis realizado:

En cuanto a la biodiversidad:

- Riqueza taxonómica a nivel de especie, o a nivel más alto o más bajo (por ejemplo, cepas para microsimbiontes).
- Abundancia (total) y biomasa (en el caso de animales) de taxa.
- Abundancia y biomasa de los grupos funcionales (GF).
- Proporciones relativas de GF.

- Índices cuantitativos generales de riqueza y equitatividad.

En cuanto al suelo, uso del suelo, intensidad de uso y cobertura de suelo:

- Cultivo aparente o uso de barbecho.
- Prácticas actuales de manejo de suelo y cultivos.
- Propiedades físicas y químicas básicas: pendiente y aspecto del suelo.
- Características de vegetación.
- Promedio de datos climáticos y precipitación real hasta la fecha de muestra.
- Historia precisa del uso de suelo desde su estado de selva no perturbada hasta otro tipo de vegetación pre-cultural.

REFERENCIAS

- Bardgett, R. D. (2005) *The Biology of Soil*, Oxford University Press, Oxford.
- Bignell, D. E., Tondoh, J., Dibog, L., Huang, S. P., Moreira, F., Nwaga, D., Pashanasi, B., Susilo, F. X. y Swift, M. (2005) 'Belowground diversity assessment: developing a key functional group approach in best-bet alternatives to Slash-and-Burn', in C. A. Palm, S. A. Vosti, P. A. Sanchez, P. J. Ericksen (eds) *Slash-and-Burn Agriculture: The Search for Alternatives*, Columbia University Press, New York.
- Brussaard, L. (1998) 'Soil fauna, guilds, functional groups and ecosystem processes', *Applied Soil Ecology*, vol 9, pp. 123–135.
- Brussaard, L., Behan-Pelletier, V., Bignell, D., Brown, V., Didden, W., Folgarait, P., Fragoso, C., Freckman, D., Gupta, V., Hattori, T., Hawksworth, D., Klopatek, C., Lavelle, P., Malloch, D., Rusek, J., Soderstrøm, B., Tiedje, J., y Virginia, R. (1997) 'Biodiversity and ecosystem functioning in soil', *Ambio*, vol 26, pp. 563–570.
- Cavalier-Smith, T. (1998) 'A revised six-kingdom system of life', *Biological Reviews*, vol 73, pp. 203–266.
- Cavalier-Smith, T. (2004) 'Only six kingdoms of life', *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, vol 271, pp. 1251–1262.
- Daily, G. C. (ed) (1997) *Nature's Services*, Island Press, Washington DC.
- Davic, R. D. (2003) 'Linking keystone species and functional groups: A new operational definition of the keystone species concept', *Conservation Ecology*, vol 7, issue 1, response 11.
- Hole, F. D. (1981) 'Effects of animals on soil', *Geoderma*, vol 5, pp. 75–112.
- Huising, E. J. (1993) 'Land use zones and land use patterns in the Atlantic Zone of Costa Rica; A pattern recognition approach to land use inventory at the sub-regional scale

- using remote sensing and GIS applying an object oriented and data-driven approach', Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- James, T. Y., Letcher, P. M., Longcore, J. E., Mozley-Standridge, S. E., Porter, D., Powell, M.J., Griffith, G. W. y Vilgalys, R. (2006) 'A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and a proposal for a new phylum (Blastocladiomycota)', *Mycologia*, vol 98, pp. 860–871.
- Jones, C. G., Lawton, J. H. y Shachak, M. (1994) 'Organisms as ecosystem engineers', *Oikos*, vol 69, pp. 373–386.
- Kibblewhite, M. G., Ritz, K. y Swift, M. J. (2008) 'Soil health in agricultural systems', *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B*, vol 363, pp. 685–701.
- Lavelle, P. (1996) 'Diversity of soil fauna and ecosystem function', *Biology International*, vol 33, pp. 3–16.
- Lavelle, P., Spain, A. V. (2001) *Soil Ecology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Lavelle, P., Bignell, D. E., Austen, M. C., Brown, V. K., Behan-Pelletier, V., Garey, J. R., Giller, P.S., Hawkins, S. J., Brown, G. G., St John, M., Hunt, H. W. y Paul, E. A. (2004) 'Connecting soil and sediment biodiversity: The role of scale and implications for management', in D. H. Wall (ed) *Sustaining Biodiversity and Ecosystem Services in Soils and Sediments*, Island Press, Washington, DC
- Lavelle, P., Bignell, D. E., Lepage, M., Volters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, W. y Dillion, S. (1997) 'Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers', *The Inventory of Soil Biological Diversity 15ES_HTSB_11-6 13/6/08 18:14* Page 15 *European Journal of Soil Biology*, vol 33, pp. 159–193.
- Lavelle, P., Decaëns, T. Aubert, M., Barot, S., Blouin, M., Bureau, F., Margerie, P., Mora, P. y Rossi, J-P. (2006) 'Soil invertebrates and ecosystems services', *European Journal of Soil Biology*, vol 42, pp. S3–S15.
- Lawton, J. H. (1996) 'The role of species in ecosystems: Aspects of ecological complexity and biological diversity', in T. Abe, S. A. Levin y M. Higashi (eds) *Biodiversity, an Ecological Perspective*, Springer, Berlin.
- Lawton, J. H., Bignell, D. E., Boulton, B., Bloemers, G. F., Eggleton, P., Hammond, P. M., Hodda, M., Holt, R. D., Larsen, T. B., Mawdsley, N. A., Stork, N. E., Srivastava, D. S. y Watt, A. D. (1998) 'Biodiversity inventories, indicator taxa and effects of habitat modification in tropical forest', *Nature (Lond)*, vol 391, pp. 72–76.
- Margulis, L. y Schwartz, K. V. (1998) *Five Kingdoms – An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*, 3rd edition, W. H. Freeman, New York.
- Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. y Brussaard, L. (2006) *Soil Biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems*, CAB International, Wallingford.

- Rappé, M. S. y Giovannoni, S. J. (2003) 'The uncultured microbial majority', *Annual Review of Microbiology*, vol 57, pp. 369–394.
- Setälä, H., Laakso, J., Mikola, J. y Huhta, V. (1998) 'Functional diversity of decomposer organisms in relation to primary production', *Applied Soil Ecology*, vol 9, pp. 25–31.
- Stork, N. E. y Eggleton, P. (1992) 'Invertebrates as determinants and indicators of soil quality', *American Journal of Alternative Agriculture*, vol 7, pp. 23–32
- Swift, M. J. (1998) 'Towards the second paradigm: Integrated biological management of soil', in J. O. Siqueira, F. M. S. Moreira, A. S. Lopes, L. G. R. Guilherme, V. Faquin, A. E. Furtini Neto y J. G. Carvalho (eds) *Soil Fertility, Soil Biology and Plant Nutrition interrelationships*, SBCS/UFLA/DCS, Lavras, Brazil, pp. 11–24.
- Swift, M. J., Heal, O. W. y Anderson, J. M. (1979) *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*, Blackwell, Oxford.
- Swift, M. J., Izac, A. M. N. y Van Noorwidjk, M. N. (2002) 'Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes – are we asking the right questions?' *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol 104, pp. 113–134.
- Tittonell, P., Vanlauwe B., de Ridder, N. y Giller, K. E. (2007) 'Heterogeneity of crop productivity and resource use efficiency within smallholder Kenyan farms: Soil fertility gradients or management intensity gradients', *Agricultural systems*, vol 94, pp. 376–390.
- Vanlauwe, B., Tittonell, P. y Mukalama, J. (2006) 'Within-farm soil fertility gradients affect response of maize to fertilizer application in western Kenya', *Nutrient Cycling and Agroecosystems*, vol 76, pp. 171–182.
- Wall, D. H. (ed) (2004) *Sustaining Biodiversity and Ecosystem Services in Soils and Sediments*, Island Press, Washington.
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. (1990) 'Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol 87, pp. 4576–4579.

CAPÍTULO 2

Diseño y estrategias de muestreo para la evaluación de la biodiversidad del suelo

E. Jeroen Huising, Richard Coe, Juvenil E. Cares, Julio N. Louzada, Ronald Zanetti, Fátima M. S. Moreira, Francis-X. Susilo, Souleymane Konaté, Meine van Noordwijk y Shiou P. Huang (†)

INTRODUCCIÓN

Gran parte de este manual contiene instrucciones de cómo tomar mediciones una vez que se tiene un sitio de muestreo, en un punto predeterminado del paisaje; también incluye cómo determinar la localización de estos sitios de muestreo: lo que se discutirá más abajo. El problema de localizar los puntos de muestreo se presenta a diferentes escalas. En una primera escala, se necesita determinar en dónde va a estar localizado todo el estudio; en otra, es necesario escoger el lugar dónde se tomarán las muestras de suelo para los análisis químicos. En algún punto entre estos dos, se encuentra el problema de la elección de los sitios. En cuanto al argumento es más complicado que una mera elección al azar; el problema gira en torno a cómo escoger el número y localización de los puntos de muestreo en el paisaje en cuestión, en los cuales se llevarán a cabo los protocolos de medición, mismos que se describirán en los siguientes capítulos.

La base del problema radica en el muestreo. Existe una larga tradición de muestreo en la ecología de campo y, por tanto, una gran experiencia al respecto. Además, se cuenta con una teoría de muestreo bien establecida, que aplica en todos los casos (Cochran, 1977). Hay numerosos textos que describen la teoría y su aplicación (ej. Southwood y Henderson, 2000; Gregoire y Valentine, 2007). Entonces ¿para qué se necesita otro capítulo que discuta las técnicas de muestreo de la biodiversidad del suelo? A pesar de los conocimientos y experiencias en rela-

ción con el tema, en cualquier proyecto habrá desacuerdos y discusiones en cuanto a las estrategias de muestreo. Son varias las razones para ello:

1. La aplicación de una teoría completa o de métodos tan extensivos como los utilizados en otros estudios, pueden discrepar en lo referente al carácter práctico del estudio que está siendo diseñado. Por ejemplo, es posible que no sea fácil tomar tantas muestras como se desearía, debido al tiempo y al costo, o bien, el acceso a sitios de muestreo ideales puede ser restrictivo.
2. La aplicación de una teoría de muestreo puede requerir de información con la que no se cuenta hasta que los datos han sido colectados. Por ejemplo, el tamaño de muestra requerido depende de la variación entre las muestras. Si datos similares no han sido colectados antes, entonces esta variación es desconocida.
3. Puede haber límites en cuanto a la teoría. Comúnmente hay malos entendidos de algunos de los principios básicos, tales como por qué el trabajo de muestreo debe ser de manera aleatoria, o qué es una réplica.
4. Los objetivos del estudio determinan el diseño. Sin embargo, estos podrían no estar completamente desarrollados o los objetivos múltiples podrían sugerir diferentes enfoques para el muestreo.
5. Los investigadores toman diferentes posturas filosóficas relacionadas con el enfoque de muestreo, están los que "Ven lo que está ahí, entonces tratan de entenderlo" y aquéllos que "empiezan con una hipótesis y tratan de probarla".

En este capítulo se describen algunas opciones para muestrear la biodiversidad del suelo y las ventajas o desventajas de los diferentes enfoques. A continuación, se presenta un ejemplo del enfoque utilizado en el proyecto CSM-BGBD.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO Y BASES DEL MUESTREO

La mayoría de los autores que escriben sobre diseños de investigación puntualizan que el diseño se determina en función de los objetivos. Kenkel *et al.* (1989) lo explican con detalle en el contexto de muestreo ecológico. Muchos de los debates sobre los métodos apropiados de muestreo se deben a diferencias de opinión en cuanto a los objetivos exactos del estudio. Ford (2000) hace referencia a una amplia discusión de los objetivos de investigación en ecología.

El muestreo aleatorio simple (MAS) constituye el punto de partida para la discusión sobre cómo muestrear. Si el objetivo es estimar la media poblacional (la biomasa media de escarabajos por m^2 dentro del área de estudio, o el número promedio de especies de hongos en 1 cm^3) el MAS adquiere propiedades relevantes. La media de la muestra es una estimación imparcial de la media poblacional, y su error estándar puede ser estimado sin hacer supuestos acerca de la variación dentro de la población (técnicamente, existe una estimación del error de muestreo basada en el diseño). Intuitivamente, esto es atractivo. La teoría, entonces, indica cómo la precisión de la estimación puede ser controlada mediante la elección de la muestra, y la precisión aumenta con un tamaño de muestra fijo, a través de la estratificación (es decir, dividir la población en sub-poblaciones o estratos, y en cada estrato tomar una muestra aleatoria). Otra alternativa al MAS consiste en usar un muestreo sistemático usando una cuadrícula, lo que se discutirá en la sección de muestreo aleatorio y sistemático.

No obstante, existen pocos estudios ecológicos cuyo objetivo sea estimar la media poblacional. Un ejemplo de un objetivo que requiere diferentes enfoques de muestreo son los inventarios. Cuando el objetivo es identificar todas las especies de un grupo dado en el área de estudio entonces el MAS resulta inapropiado. Piense en un nicho raro en el paisaje (por ejemplo, el caso de las orillas de un estanque, situado en el lindero entre el bosque y la pradera, existirá solamente una pequeña porción del área de estudio ocupada por este tipo de nichos. Si el objetivo del estudio es estimar la biomasa media de escarabajos en general, no importará si los nichos raros son omitidos o no, pero si el propósito es realizar un inventario de especies, entonces los nichos raros deben ser incluidos.

La mayoría de los estudios, incluyendo los del proyecto CSM-BGBD, intentan entender los patrones en la biodiversidad. Un enfoque de muestreo consiste en coleccionar datos usando el método de MAS o mediante una cuadrícula, intentando describir patrones (por ejemplo, análisis de conglomerados y ordenación) y luego explicarlos (por ejemplo, encontrando correlaciones con variables ambientales). Otra alternativa es formular algunas hipótesis predictivas para explicar los patrones en la biodiversidad, y luego diseñar un estudio cuyo objetivo específico sea probar estas hipótesis. Los seguidores del primer enfoque pueden argumentar que no quieren ser prejudiciados por hipótesis previas, argumentando que si se empieza partiendo de un objetivo limitado, su imaginación y descubrimientos potenciales podrían estar restringidos, por lo que prefieren mantener la mente abierta y partir de la observación. Por supuesto, en ecología, se han hecho im-

portantes descubrimientos por casualidad, sin seguir estudios planeados; además, cada investigador debería estar abierto a la posibilidad de observaciones no anticipadas y explicaciones verdaderamente nuevas. Sin embargo, existen tres razones para tratar de diseñar un estudio con objetivos específicos que incluyan hipótesis comprobables:

1. Los descubrimientos inesperados usualmente tienen la naturaleza de formulación de hipótesis observacionales que sugieren explicaciones. Se requiere de estudios minuciosamente planeados para poder probar dichas explicaciones.
2. De hecho, los que proponen el enfoque “no hipotético” en realidad parten de alguna forma de hipótesis, aunque ésta sea implícita. Por ejemplo, sin alguna noción de los factores ambientales que puedan controlar la biodiversidad, es imposible elegir cuáles, entre un número infinito de factores, deberían ser medidos en los sitios de muestreo. Si las hipótesis implícitas se hacen explícitas el diseño de los estudios pueden ser mejorado.
3. Si se parte de hipótesis específicas, frecuentemente, es posible mejorar el diseño del estudio, haciéndolo más eficiente.

Este último punto subraya o enfatiza gran parte de lo que sigue en este capítulo. Si suponemos la hipótesis de que la biodiversidad del suelo en parcelas agrícolas, está determinada por el nivel de Perturbación (P) y el nivel de Materia Orgánica del Suelo (MOS) y se colectan los datos por medio del MAS o por muestreo de cuadrícula, entonces es probable que:

- La mayoría de los sitios de muestreo tengan valores de P y MOS alrededor de la media con, relativamente, pocos puntos con valores altos o bajos. No obstante, si se trata de entender la relación entre la biodiversidad del suelo y la MOS o la P, son los puntos más extremos los que proporcionan más información (Figura 2.1). La estratificación puede usarse para incrementar el número de puntos con MOS más extremos y mejorar la estimación de la relación sin incrementar el número de muestras.
- La MOS y la P pueden estar correlacionadas; por ejemplo, parcelas con un valor alto de P, frecuentemente, tienen valores bajos de MOS. Entonces es difícil y hasta imposible, separar los efectos de las dos variables; no obstante, el estudio podría ser diseñado para incluir específicamente algunas muestras con valores altos de P y de MOS y otras muestras con valores bajos de P y de MOS.

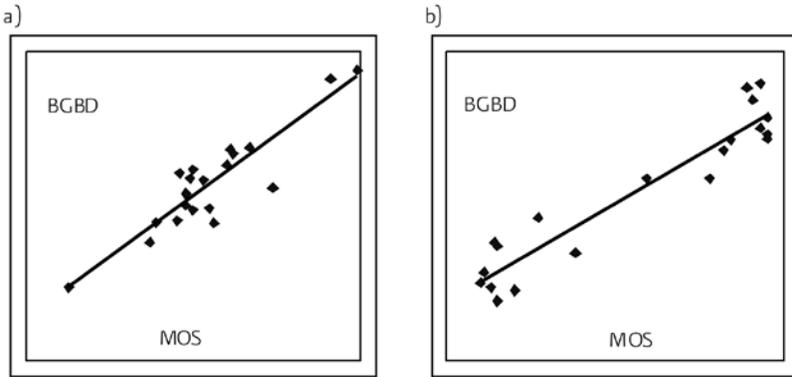
Entonces, los efectos de ambas variables, y sus efectos combinados pueden ser estimados.

En la práctica, puede que sea imposible o inútil producir un solo índice de biodiversidad del suelo, como el que se observa en la Figura 2.1 y las relaciones pueden ser más complejas que el caso de dos líneas rectas; sin embargo, se aplican los mismos principios de diseño.

Otro ejemplo de una hipótesis implícita en muchos de los estudios es la escala espacial en la que ocurren los patrones interesantes. Cuando se determina la distancia entre los sitios de muestreo y el tamaño total del área de estudio, el investigador hace una selección de las escalas importantes para su estudio. Si éstas se seleccionan explícitamente, entonces se abren nuevos debates con una probabilidad de mejorar el diseño del estudio.

El objetivo global del proyecto CSM-BGBD fue comprobar la hipótesis de que un incremento en la intensidad del uso del suelo cambia la biodiversidad del suelo (más específicamente, señala una pérdida de biodiversidad del suelo). Este planteamiento es muy amplio, pero aún puede resultar útil cuando se enfoca con un diseño de muestreo. En términos ideales, dicha investigación iría acompañada de un experimento. La única manera cierta para determinar el efecto de un cambio, es hacer justamente el cambio y esto precisamente constituye la base de un enfoque experimental; sin embargo, no siempre resulta viable. Si tenemos que utilizar un diseño de estudio observacional, en lugar del experimental, lo ideal sería llevar a cabo un estudio longitudinal, en donde las parcelas sean monitoreadas a través del tiempo para observar si los cambios en la biodiversidad del suelo pueden ser correlacionados con cambios en el uso del suelo. Lo anterior, generalmente, tampoco es viable en un proyecto de duración fija y corta, puesto que se desconoce el tiempo necesario para el monitoreo. En el presente estudio, como en muchos otros, se utiliza una aproximación transversal, considerando un rango de usos de suelo en un momento específico de tiempo. Se espera que las correlaciones entre la intensidad de usos de suelo y la biodiversidad del suelo reflejen alguna conexión causal, que indiquen lo que pasaría con la biodiversidad del suelo si los usos de suelo cambian en el futuro. Aunque la validez de este enfoque puede ser cuestionable, muchas veces es la única opción disponible. Las discusiones en este capítulo sólo consideran esquemas alternativos de muestreo para datos colectados por el método transversal.

Figura 2.1 Diseños para estimar la relación entre biodiversidad del suelo y MOS: a) muestreo aleatorio o en cuadrícula, probablemente arrojará la mayoría de los valores de MOS cercanos a la media, dando un estimado pobre de la pendiente; b) si se incluyen de manera deliberada valores de MOS más extremos, por estratificación, esto aumentará la precisión de la estimación de la pendiente.



ENFOQUES PRÁCTICOS

El diseño de un esquema de muestreo exitoso y práctico es todo un arte. Requiere de un entendimiento profundo, con base científica y de las propiedades que ofrecen los diversos métodos; no obstante, es necesario que se combine con las restricciones prácticas impuestas por costos, tiempos y disponibilidad de expertos. Asimismo, podría surgir una serie de restricciones adicionales, por ejemplo, el acceso limitado a localidades deseadas para muestrear, o bien, la necesidad de transportar con rapidez las muestras desde el campo hasta el laboratorio. Los detalles de cómo dichos factores prácticos y teóricos pueden mezclarse, serán diferentes para cada estudio y darán a cada investigación un aspecto único. Sin embargo, es posible que se especifiquen algunos pasos del proceso en general que se deben seguir en cualquier estudio.

Paso 1: Defina objetivos

Como se indicó en la sección de objetivos del estudio y bases de muestreo, los objetivos determinan todos los aspectos del diseño, por lo tanto, desde un principio deberán ser expresados de manera clara y precisa. Escríbalos y compártalos con otros para

que pueda discutir algunas sugerencias. Consiga el mayor número de comentarios y sugerencias de los expertos en la materia. Estos expertos pueden ser investigadores que trabajan sobre temas similares en otros lugares, otros que han trabajado en el mismo sitio, o bien, otros que tienen experiencia en los métodos que va a utilizar.

Una herramienta que ayuda a refinar los objetivos es la presentación de resultados simulados. Imagínese que ha finalizado el estudio y ha obtenido resultados ¿Qué tablas y gráficas le gustaría presentar?, ¿Cuáles cumplen con sus objetivos y proveen evidencia para su hipótesis?, anótelas y numérelas. La Figura 2.1 es un ejemplo simple. Después deberá comprobar con cuidado que: a) los resultados realmente logren los objetivos y b) que el diseño de muestreo simulado realmente pueda mostrar estos resultados.

Paso 2: Consulte otros estudios

Consulte los estudios relacionados con su investigación. Cada estudio cuenta con aspectos únicos y siempre habrá estudios previos de los cuales puede aprender: ésto le permitirá entender qué aspectos de los métodos utilizados han tenido éxito y cuáles limitan la eficiencia y calidad de los resultados. Anote específicamente el tamaño de las muestras utilizadas y la variación de los resultados.

Paso 3: Reúna datos relacionados

Reúna información o antecedentes que serán necesarios para diseñar los detalles del muestreo. Estos incluyen: mapas topográficos (ej., indican la estratificación por altitud o nos permiten entender los problemas de acceso), imágenes de detección remota (ej., mapas de cobertura del terreno), mapas de uso de suelo (ej., para identificar los principales usos del suelo que se incluirán en el estudio), datos meteorológicos (ej., para ayudar a decidir cuáles son las temporadas idóneas para el muestreo de campo).

Paso 4: Elabore un diseño

Elabore un diseño tentativo utilizando una combinación de principios generales, su propia experiencia, diseños utilizados en otros estudios y su imaginación. Si bien puede haber aspectos sobre los cuales tenga poca idea, siempre deberá plantear un proyecto realista. Escriba el diseño con tantos detalles como sea posible.

Paso 5: Revise su diseño

Comparta su diseño con otros investigadores para que expresen su punto de vista y sus comentarios. De nuevo, éstos pueden ser personas que han trabajado con temas similares, que han usado métodos similares o que han trabajado en la localidad o simplemente, que expresan su opinión acerca de su tema. Trate de incluir un estadista con experiencia en investigación en ecología. Un buen estadista, probablemente, considerará algunos aspectos que pueden pasar desapercibidos por el ecólogo.

Paso 6: Realice una prueba piloto

Pruebe su enfoque. Una investigación piloto abre la posibilidad de evaluar el aspecto práctico del esquema de muestreo. Asimismo, permita probar y refinar los protocolos de medición, procedimientos de manejo de datos, etc., también permita estimar el tiempo del muestreo y el procesamiento de las muestras. De ser posible, procese algunos datos hasta llegar a un análisis estadístico, esto dará una indicación de la variabilidad, lo que puede ser útil para ayudar a decidir el tamaño final de la muestra.

Paso 7: Revise los pasos

En cualquier paso, puede ser que tenga que retroceder a un paso anterior para volver a intentar. En particular, revise los objetivos a la luz de nueva información; un error común es obtener información que sugiere que los objetivos son inalcanzables, pero deberá seguir adelante.

JERARQUÍA, REPLICACIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA

La mayoría de los diseños de estudio son jerárquicos y el problema de muestreo no sólo consiste en seleccionar el sitio de muestreo dentro del área de estudio. El proyecto CSM-BGBD es un buen ejemplo, puesto que involucra varios países. Dentro de cada país, fueron seleccionadas una o más áreas de estudio. En cada área, uno o más sitios de estudio (etiquetadas como “ventanas”) fueron seleccionados. Dentro de cada sitio de estudio alrededor de 100 puntos de muestreo fue-

ron seleccionados y en cada punto se tomaron muestras (el protocolo de medición determina más capas en la jerarquía, como consecuencia de la extracción de cuatro muestras tomadas para la caracterización del suelo y sub-muestras de éstas para los análisis químicos).

En cada capa jerárquica, se plantean las mismas preguntas: ¿cuántas unidades deberían de ser seleccionadas?, ¿cuáles son? En los niveles más altos, las respuestas no necesariamente estarán basadas en la ciencia. La selección de algunos países puede estar basada en función de su política o de los intereses de algunas agencias financiadoras e investigadores que dirigen el proyecto, pero, en algún nivel, dicha selección se deberá basar en los objetivos del estudio y en la aplicación de algunos principios.

Lo primero es centrarse en la idea de una teoría de muestreo de una “población”. La terminología es confusa y no tiene nada que ver con una población biológica. La intención es saber a qué se refieren sus resultados. Como ejemplo, se podría estudiar la biodiversidad del suelo en fincas alrededor de los límites del bosque en el monte Kenia, lo que requerirá de una muestra de fincas pertenecientes a esta localidad. Si se desean resultados que apliquen a los límites del bosque de África del Este en general, entonces también se necesitará una muestra de otros bosques. Sin eso, sólo podemos hacer afirmaciones sobre el monte Kenia con base en los datos obtenidos y no es posible extrapolarlos a otros lugares. El muestreo implica que el conjunto sobre el que nosotros queremos hacer inferencias (“la población”) necesita ser delimitado antes de que un esquema de muestreo pueda ser planteado.

La segunda idea es la de replicación, que trata de mantener la consistencia de patrones y relaciones. El objetivo de la investigación es encontrar algunos patrones, tales como los patrones de la diversidad del suelo, relacionados con los usos de suelo. Los patrones de interés son los que mantienen una consistencia a través de un número de casos, ya que estos patrones pueden utilizarse para hacer predicciones y pueden reflejar algunas reglas o procesos. Por lo tanto, es necesario repetir observaciones con el fin de determinar si los patrones son realmente consistentes. Suponga que cuenta con diez muestras tomadas de un bosque y diez en las cercanías de campos cultivados y que las muestras de bosque tienen consistentemente una alta biodiversidad del suelo ¿qué podría concluir? Si las muestras fueron seleccionadas de manera apropiada, puede concluir (con un grado conocido de incertidumbre, evaluada mediante un análisis estadístico) que las muestras de bosque contienen mayor diversidad que las de los campos cultivados; aunque, estricta-

mente hablando, sólo podrá concluir que ese bosque en particular es más diverso y no, los bosques en general. Si busca una conclusión válida para los bosques, deberá buscar una consistencia en varias de ellos.

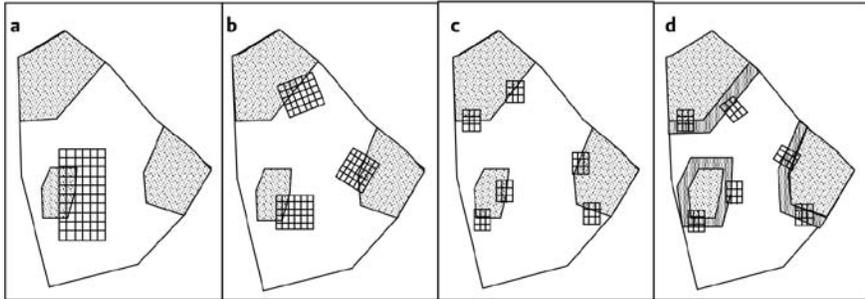
Dentro de un estudio jerárquico, las unidades de nivel más alto, como los sitios de estudio pueden proveer un nivel de replicación, por lo tanto, patrones consistentes entre sitios, probablemente, representan una “regla” aplicable ampliamente. Dentro de cada sitio de estudio se podrán establecer conclusiones más contundentes si por ejemplo, varios bosques son muestreados. Sin embargo, muestras múltiples de un mismo bosque no sirven al mismo propósito, puesto que representan “pseudo-réplicas”. El que muestras repetidas dentro de un bosque sirvan para ser interpretadas de igual manera que las muestras de diferentes bosques depende de las propiedades de los datos y no, del diseño de muestreo. Un enfoque más certero es asegurar una replicación válida y algunos resultados genéricos, a través de un diseño que replique bosques y otros elementos de uso de suelo.

Algunas de las implicaciones de estas ideas en el muestreo de cuadrícula son ilustradas a través de un ejemplo simplificado que se muestra en la Figura 2.2. El objetivo es muestrear un paisaje con dos usos de suelo, etiquetados como: “bosque” y “agricultura”, para poder examinar las diferencias en la biodiversidad del suelo. En la Figura 2.2a, ha sido construida una cuadrícula de tal manera que incluya los dos usos de suelo. Dicha cuadrícula es una “ventana” con 77 puntos de muestreo (intersecciones) definidos. En la Figura 2.2b se pueden observar tres ventanas más pequeñas para muestrear tres diferentes parches de bosque y no uno solo. La replicación puede aumentarse y abarcar más área total observada, utilizando más ventanas y más pequeñas (Figura 2.2c).

Una crítica a este tercer tipo de diseño es que todos los sitios de muestreo en tierras agrícolas quedan cerca de un límite de bosque, por lo que no pueden ser considerados representativos del uso de suelo. Una respuesta a esto es definir una nueva categoría de “límites de bosque” y asegurar ventanas en los tres sitios de muestreo (Figura 2.2d). Nótese que no es necesario muestrear todos los usos de suelo en cada ventana. Si este proceso de reducir el tamaño de las ventanas mientras se incrementa su número se continúa, entonces en algún momento se perderán las ventajas posibles de muestrear por cuadrícula y se terminará con un diseño que podría parecer un muestreo aleatorio de sitios individuales.

La palabra “escala” es confusa y controversial en la ecología (Peterson y Parker, 1998), pero queda claro que la escala en que se anticipan o hipotetizan los patrones, determina el nivel jerárquico donde se requiere tener réplicas. Por ejemplo, la

Figura 2.2 Cuatro enfoques para utilizar muestreo en cuadrícula en un paisaje con dos usos de suelo, selva y agricultura: a) una cuadrícula sencilla que incluye un parche de selva; b) tres cuadrículas que muestrean tres diferentes parches de selva; c) incrementando la replicación; d) reconociendo los límites como otra categoría.



hipótesis puede ser “la biodiversidad del suelo en parcelas agrícolas decrece con el aumento a la distancia del límite del bosque”. Lo anterior, puede ser investigado con parcelas (sitios de muestreo) en un intervalo de distancias, con réplicas en cada distancia. Una hipótesis diferente sería “la biodiversidad del suelo en parcelas agrícolas decrece con la reducción de la cobertura del bosque en el paisaje”. En este caso, se necesita definir el significado de “en el paisaje”, es decir, la escala espacial en que se evaluó la cobertura del bosque; suponiendo que fue definida como áreas de 1 km^2 . Entonces la hipótesis necesita una muestra de una unidad de 1 km^2 , con varios niveles de cobertura de bosque. Ahora es la réplica quien determina la necesidad de varias áreas en cada nivel de cobertura de bosque. Para poder evaluar la biodiversidad del suelo dentro de un 1 km^2 , se requerirá de más muestras, con la definición de algunos sitios dentro de cada unidad. La réplica dentro de la unidad es importante para determinar la precisión con que la biodiversidad del suelo es medida para cada unidad, pero no es relevante para afirmar la consistencia del patrón a través de la unidad de 1 km^2 necesaria para examinar las hipótesis.

En otras áreas de la ecología, factores del paisaje como la fragmentación del bosque, afectan los procesos; por lo tanto, los objetivos de un proyecto de biodiversidad del suelo pueden incluir “análisis del paisaje”. Los dos ejemplos del párrafo anterior son análisis que utilizan factores del paisaje; sin embargo, se basan en datos de diferentes niveles jerárquicos: uno, utiliza datos en el nivel de parcela y el otro, datos en el nivel de unidades de 1 km^2 . El mensaje es claro: “el nivel de paisaje” no está bien definido y, si se intenta hacer un “análisis en el nivel de paisaje”, no queda claro el diseño de muestreo que se necesita.

Una vez que se sepa lo que hay que replicar, los métodos estándares están disponibles para ayudar a seleccionar el tamaño de muestra, al igual que el *software* para iniciar el análisis. Los métodos requieren conocimiento de dos cosas: de la magnitud de las diferencias (por ejemplo, la diversidad del suelo entre dos usos de suelo) que es importante detectar, y la variabilidad entre réplicas del mismo uso de suelo. Queda claro que la decisión sobre el tamaño de muestra depende de esto, pero normalmente resulta difícil especificarlos. Cuando la investigación es dirigida a medir respuestas económicas para decisiones de manejo (por ejemplo, la respuesta de un cultivo a un fertilizante) entonces es viable especificar la respuesta mínima que es importante detectar. No obstante, cuando el objetivo de la investigación es detectar y entender algunos procesos, muchas veces no es posible especificar un tamaño de muestra que resulte importante.

Una estimación aproximada de la varianza puede ser obtenida de estudios previos, pero saber qué relevancia tendrá en nuevos ambientes puede ser desconocida. Otra complicación surge a partir de las respuestas multivariadas de interés. Los métodos estándares presumen que existe una respuesta medible de la biodiversidad del suelo que se puede utilizar para obtener el tamaño de muestra; sin embargo, ningún estudio real ha multiplicado las respuestas de interés, como la diversidad de diferentes grupos funcionales, medida de diferente manera; números, biomásas y proporciones de estos grupos funciones o especies, etc. Por lo tanto, en la práctica, el tamaño de muestra se ha basado en una combinación de información de métodos formales (lo que puede indicar los órdenes de magnitud requeridos), y estudios previos similares y pilotos.

Enfoques secuenciales (Pedigo y Buntin, 1993) permiten continuar con el muestreo hasta que algunos criterios se cumplan. Aunque sean teóricamente atractivos, es improbable que sean prácticos para los estudios de biodiversidad del suelo porque el trabajo necesita planearse en distintas fases de campo y de laboratorio, con muchas mediciones que sólo están disponibles después de un largo periodo de muestreo en campo. El muestreo adaptativo (Thompson y Seber, 1996) permite que el diseño responda a patrones que se detecten. Si bien existe cierta atracción por esta idea, es improbable su viabilidad, dada la necesidad de planear campañas de campo por adelantado. Una variedad de diseños a multi-escala han sido utilizados en estudios ecológicos. La idea de estos diseños es elegir posiciones de muestreo, de tal manera que los patrones, a diferentes escalas, puedan ser investigados. Los patrones a escala fina requieren puntos muy cercanos. Patrones a escala más grande, requieren puntos más lejanos. Por lo tanto, se incluyen ambos

y los diseños eficientes tienen una estructura en forma de conglomerado (Urban *et al.*, 2002; Stein y Ettema, 2003).

En cada sitio de muestreo seleccionado, se requiere tomar muestras (ver esquema de puntos de medición abajo). Piense en un lugar seleccionado, no en función de un punto, sino de una parcela, quizá en un área del orden de 100 m². Necesitará muestrear dentro de toda esta parcela, pero únicamente un volumen de suelo muy limitado puede ser examinado en la mayoría de las mediciones de biodiversidad del suelo y se toman varias muestras para poder representar toda la parcela. Normalmente, dentro de cada parcela se reúnen las muestras; lo que quiere decir que se mezclan varias muestras de suelo, antes de cuantificar la biodiversidad del suelo; existen dos razones para ello: una, simplemente es práctica, puesto que habría demasiadas muestras para procesar si no fuera así; la segunda, responde a la necesidad de contar con mediciones iguales de diferentes grupos funcionales del suelo. Cuando varios grupos de especies están siendo evaluados, seguramente las relaciones entre ellos son importantes; esto quiere decir que se tiene que medir en el mismo lugar. No obstante, normalmente sólo resulta posible examinar un grupo en una muestra de suelo dada y la extracción de la muestra de un grupo, podrá alterar otros grupos. Así, todas las mediciones se realizan a nivel de parcela; esto significa que la variación y los patrones en la escala dentro de la parcela (por ejemplo, <10 m) no se han examinado.

ENFOQUE DE OBJETIVOS: ESTRATIFICACIÓN

En la introducción de este capítulo, se sugiere que un buen enfoque en los objetivos de un estudio mejorará la eficiencia en su diseño e incrementará la posibilidad de lograrlos. El objetivo de descubrir y entender los efectos del uso de suelo en la biodiversidad del suelo, requieren establecer comparaciones en diferentes usos de suelo. Un buen enfoque para mejorar el diseño de muestreo es el uso de la “estratificación”, lo que asegura que se obtengan muestras realmente representativas, de tamaños adecuados, para cada uso de suelo. En este sentido, los estratos son áreas con diferentes usos de suelo y la idea es obtener, de manera deliberada, muestras de cada uno de ellos. Algunas veces se piensa que este enfoque puede estar “sesgado” porque los tipos de uso de suelo para tomar las muestras se determinan *a priori*. Si los datos se usan para hacer afirmaciones sobre el área de estudio en general (por ejemplo, el número promedio de escarabajos por m²) sin tomar en cuenta un diseño, entonces los resultados pueden estar sesgados, y los diferentes usos de

suelo pueden no estar representados en las muestras, con frecuencias proporcionales a su ocurrencia en el área de estudio. Sin embargo, el diseño no es parcial para el objetivo de comparar los usos de suelo y además es eficiente. Si se cuenta con un total de N muestras para comparar dos usos de suelo entonces, en ausencia de alguna otra información, el mejor diseño es tener $N/2$ en cada uno de los dos grupos. Con un enfoque de muestreo estratificado, podemos elegir un tamaño idóneo de muestra para cada uso de suelo.

Si se emplea este enfoque, entonces existen dos prerrequisitos:

1. Se necesita saber cuáles son los usos de suelo a comparar y contar con definiciones precisas de ellos.
2. Las localizaciones de estos usos de suelo deben ser conocidas. Se requiere de un mapa de uso de suelo del área bajo estudio.

El primer aspecto hace que algunos investigadores se sientan incómodos ante la idea de que una predefinición de uso de suelo para la investigación excluya el descubrimiento de patrones potencialmente importantes. La predefinición, sin embargo, tiene que considerarse en algún momento, al igual que la necesidad de definir con precisión. Por ejemplo, ¿dónde se encuentra el límite entre “pastizales con árboles” y “bosque secundario”?; ¿cuándo se debe uno de mover a lo largo de un gradiente para incrementar la cobertura de árboles? Aquí tenemos otra ganancia potencial en la eficiencia del pensamiento a través de estos requerimientos en el diseño y no sólo en la etapa de análisis. Si un diseño de muestreo no toma en cuenta el uso de suelo, entonces probablemente muchos de los sitios de muestreo seleccionados terminarán siendo posiciones ambiguas en lo que se refiere a la definición de uso de suelo, puesto que no habrá certeza en cómo clasificarlas. En un enfoque estratificado, las áreas ambiguas pueden ser excluidas del muestreo. Por supuesto, si el objetivo es hacer un inventario del paisaje, no es deseable excluir algunos usos de suelo, ni aquellas zonas de transición que puedan ser importantes, pero si el objetivo es investigar los efectos de uso de suelo, tiene sentido excluir tales sitios.

Si los objetivos incluyen investigación en límites entre áreas de diferentes usos de suelo o de nichos raros, por ejemplo, rasgos lineales, éstos deberán ser incluidos específicamente en el muestreo; de no ser así, es probable que la muestra incluya únicamente algunas observaciones de estas categorías, a partir de las cuales no se podrán establecer conclusiones. Resulta más eficiente incluirlas en un número

suficientemente grande, si los objetivos lo requieren, o bien, excluirlas (dándoles un equivalente de tamaño cero), si los objetivos no lo requieren. Nótese que muchos de estos argumentos también aplican cuando los factores hipotéticos que influyen sobre la biodiversidad del suelo, no son usos de suelo *per se*, sino variables ambientales, influenciadas por el uso de suelo, tales como la MOS o la frecuencia de fuego. El no contar con un mapa de usos de suelo, el que estos no tengan una resolución idónea, no es una limitante, ya que existe la posibilidad de la interpretación de imágenes por sensores remotos (SR). Cuando se usan variables como la MOS en la estratificación, puede ser útil hacer un monitoreo rápido de la MOS, calibrarlo en un mapa de uso de suelo, o en imágenes de SR y utilizar esto para definir los estratos.

MUESTREOS ALEATORIO Y SISTEMÁTICO

Las razones esenciales para utilizar el muestreo aleatorio simple (MAS) fue descrito anteriormente y son detalladas en textos tales como Cochran (1977). Para la implementación del MAS es necesario delimitar el área de estudio, y seleccionar los sitios de muestreo de manera aleatoria, de tal modo que: a) cada punto tenga las mismas posibilidades de ser seleccionado, y b) la selección de un punto no cambie la probabilidad de incluir cualquier otro punto. El muestreo aleatorio estratificado requiere hacer lo mismo en cada estrato. El uso de un *software* para ayudar en la aleatorización y un GPS para localizar los puntos de muestreo en el campo, resultan muy útiles en la práctica. Sin embargo, los estudios ecológicos no siempre usan un muestreo aleatorio, algunas veces por una buena razón.

Un enfoque común no aleatorio es una selección subjetiva de los sitios de muestreo, por ejemplo, cuando se toman muestras en lugares considerados interesantes o importantes, que frecuentemente sirven como base para seleccionar unidades de muestreo a niveles jerárquicos más altos. Aunque a veces es necesario, la limitante de este enfoque es la posible falta de "representatividad" del área de muestreo (la medida en que los resultados pueden razonablemente ser asumidos para aplicarlos a una población más grande) porque ésta depende de la percepción del ejecutor y no, de la propiedad inherente del diseño. Ello queda, por lo tanto, abierto al debate cuando los resultados son presentados. Si se toma un tamaño de muestra subjetivo igual a 1, esto es equivalente a limitar el área de estudio. Por ejemplo, cuando una "ventana" única se coloca en un área, entonces dicha área queda representada por esa ventana y el hecho de

que esa área sea o no, representativa dependerá únicamente de la habilidad del ejecutor.

El muestreo sistemático tiene muchas aplicaciones en la ecología, usando transectos de una dimensión o cuadrículas de dos dimensiones. En el caso de los transectos, las muestras son seleccionadas en puntos que se encuentran a una distancia fija entre sí, a lo largo de una línea predeterminada. Para un muestreo de cuadrícula, una cuadrícula rectangular (usualmente) es definida en el área y las muestras son tomadas en cada punto de intersección. Las ventajas potenciales de este tipo de muestreo sistemático se derivan de la teoría y de la práctica. Las ventajas de la práctica incluyen:

- La facilidad de localizar puntos de muestreo, describir su ubicación y los medios de llegar a los puntos de muestreo; por ejemplo, el protocolo puede ser algo tan simple como “desde el punto de partida, camino al norte y muestreo cada 50 m”.
- La facilidad de planear el trabajo de campo; por ejemplo, de estimar el tiempo requerido para muestrear un número fijo de puntos.

La razón estadística para utilizar muestreos sistemáticos es que pueden ser eficientes (Webster y Oliver, 1990). Si se considera un estudio con el propósito de calcular la media o el total de algún parámetro (por ejemplo, el carbono total en el suelo en el área de estudio o la media de escarabajos por m²). Si la cantidad medida no es constante, una muestra que utilice la cuadrícula dará una mejor estimación que una simple muestra al azar del mismo tamaño, lo que frecuentemente es el caso de variables ambientales y biológicas. La eficiencia se basa en el hecho de que puntos cercanos son similares, por tanto, no proporcionan mucha información nueva; mientras que en la cuadrícula las muestras están de manera uniforme en toda el área de estudio. Por razones similares, el enfoque de cuadrícula resultará útil para compilar el inventario de un área bajo estudio, salvo que puede excluir nichos raros (véase abajo). Sin embargo, hay aspectos negativos:

- Algunos puntos de la cuadrícula tendrían que ser excluidos del estudio, tales como caminos o cuerpos de agua.
- Las cuadrículas incluyen muestras de diferentes usos de suelo, con un tamaño más o menos proporcional en cada tipo de uso de suelo. En particular, tipos de uso de suelo raros pueden ser omitidos, lo que se puede compensar moviendo

la ventana y añadiendo puntos, aunque el proceso podría llegar a ser arbitrario y subjetivo.

- Algunas veces no es posible caracterizar el uso de suelo claramente en cada punto de muestreo.

Estos puntos están relacionados con el problema discutido en la sección “enfoque de objetivos: estratificación”. Si el objetivo del estudio es comparar clases de uso de suelo, entonces el muestreo por cuadrícula, a veces, no los captura de forma óptima, de manera que las cuadrículas y los transectos probablemente son más apropiados para muestrear la biodiversidad del suelo, cuando a) no existe ningún objetivo explícito o hipótesis que involucre comparaciones o relaciones con variables ambientales, o b) la hipótesis se refiere a una unidad espacial de un nivel más alto que la escala en que el muestreo por cuadrícula o por transecto fue hecho. Por ejemplo, Swift y Bignell (2001) recomiendan transectos de 40 m de largo, pero éstos quedan dentro de cada clase de uso de suelo. Cuando se comparan usos de suelo, se hacen réplicas de los transectos y se asignan aleatoriamente los estratos definidos por diferentes usos de suelo.

De esta forma, el muestreo sistemático por cuadrícula o transecto, normalmente, es combinado con un muestreo aleatorio. Por ejemplo, puede haber varias cuadrículas definidas como se aprecia en la Figura 2.2d, con una localización y orientación hecha al azar. De manera similar, el punto de inicio y la orientación de los transectos que se repiten pueden ser hechos aleatoriamente. Los transectos también pueden ser útiles cuando se alinean con gradientes ambientales considerados importantes; esto se conoce como “gradsectos” (Wessels *et al.*, 1998). Con la aleatorización en algún nivel en la jerarquía, es posible hacer un análisis estadístico basado en las propiedades aleatorias del diseño; por ejemplo, si un número de cuadrículas pequeñas es colocado aleatoriamente en el área de estudio, entonces contamos con las réplicas necesarias para establecer una consistencia, a través de patrones encontrados.

El análisis estadístico elegido para una muestra tomada en un diseño sistemático no puede estar basado en la aleatorización, porque los sitios no fueron seleccionados de manera independiente dentro de cada cuadrícula. Existen dos posibles enfoques para el análisis: el primero asume que los datos se comportan de forma aleatoria (por ejemplo, las propiedades estadísticas son las mismas, como si el punto hubiera sido localizado aleatoriamente); el segundo, es utilizar un modelo explícito de patrones espaciales. En la mayoría de los análisis que buscan relaciones entre variables ambientales y la biodiversidad del suelo se usa el primer análisis,

principalmente, porque las alternativas son complejas. Las consecuencias de suponer esto son raramente investigadas.

Es claro que la distancia y el tamaño total de la cuadrícula determinan la escala de los patrones que pueden ser detectados. No es posible observar patrones (por ejemplo, agregación de la biodiversidad del suelo) a escalas espaciales menores que las distancias entre los puntos de la cuadrícula; de la misma manera, tampoco será posible detectar patrones más grandes que el tamaño total de la cuadrícula. Sólo se pueden reconocer los patrones cuando existen varias repeticiones dentro de la misma cuadrícula. Es este aspecto de escala de patrones, definido por los objetivos del estudio, el que debería determinar los espacios y el tamaño total de la cuadrícula.

Algunas veces se sugiere que los espacios deben ser de tal manera que los puntos vecinos no estén correlacionados. Esta noción de correlación espacial es importante, pero también confusa. La correlación entre las mediciones de una determinada distancia, no es una cantidad absoluta, pero es una medida relativa a un promedio (técnicamente, el problema tiene que ver con el recambio). Para poder ver esto, piense en analizar datos de una sola ventana en Kenia, donde los puntos de una distancia de más de 200 m entre sí, pueden no indicar similitud en la biodiversidad del suelo, pero si juntamos los datos con otra base de datos global se esperaría encontrar similitud, no sólo en los puntos que pertenecen a una misma ventana, sino entre todos los puntos dentro de Kenia.

HABLANDO DE VARIABILIDAD

La experiencia de estudios pasados sugiere que se debería de esperar un alto nivel de variación en muchas de las mediciones principales de la biología del suelo. Aún cuando se trata de distancias cortas, se puede esperar una variación grande en número y diversidad de diferentes grupos funcionales. En paisajes agrícolas tropicales la variación dentro de una categoría de uso de suelo puede ser debida a las prácticas de manejo, la variación en las características de la vegetación, las diferencias históricas en el uso de suelo de la parcela, efectos de borde, posición topográfica y características biofísicas. Si los métodos formales para determinar los requerimientos del tamaño de muestra fueran seguidos, probablemente indicarían un tamaño de muestra mucho más grande de lo es viable o costeable, ¿Qué se debe hacer entonces?

Primero, ¡no tiene sentido no hacer nada! Simplemente, si se sigue con un tamaño de muestreo preconcebido, no se alcanzarán los objetivos; si el plan original fue

trabajar con diez muestras por cada uso de suelo dentro de un sitio de referencia, y las indicaciones son que se necesitan alrededor de 100 muestras por cada uso de suelo, no tiene sentido continuar, puesto que se terminarán obteniendo resultados vagos y no concluyentes, los cuales se traducirán en errores estándares altos y sin efectos significativos cuando se analizan los datos. Tres son las posibles opciones:

1. Incrementar el tamaño de muestra.
2. Utilizar métodos de muestreo para reducir la variabilidad.
3. Reducir la amplitud del estudio.

La primera opción no resulta práctica en la mayoría de los casos, pues siempre hay limitaciones de tiempo, dinero, recursos y experiencia. Existen varios métodos para reducir la variabilidad de las muestras; los más útiles consisten en la estratificación y la congruencia. Nótese que el uso del término “estratificación” se usa para el muestreo, pero es diferente a cómo se aplica en “enfoque de objetivos: estratificación” (arriba). Si algunas fuentes de variabilidad pueden ser previstas, éstas pueden ser usadas para definir estratos y removerlas del análisis. Por ejemplo, si el sitio de estudio cubre un rango de altitudes, se puede esperar una variación en la biodiversidad del suelo dependiendo de la altitud. La estratificación, entonces, divide el sitio de estudio en zonas de altitud y los sitios de muestreo dentro de cada una de ellas. En esta fase del análisis de datos, la variación de los usos de suelo se compara dentro y entre estratos para no oscurecer los resultados. Este enfoque requiere que algunos (no todos) de los diferentes usos de suelo estén localizados dentro de zonas de altitud. Si el uso de suelo únicamente varía con la altitud, entonces los dos factores están confundidos y sus efectos en la biodiversidad del suelo no se distinguen. Dado que existe una variación ambiental, la variabilidad en la biodiversidad del suelo estará en respuesta a la variación ambiental. Consecuentemente, los estratos pueden ser útiles para definir puntos de muestro cercanos geográficamente. Las ventanas en la figura 2.2 pueden ser vistas de esta manera.

Comparar conlleva la idea de la estratificación a un extremo. Imagine que si dos de los usos de suelo a comparar son bosque y campos de maíz, se puede esperar que la biodiversidad del suelo dependa de muchas variables ambientales, tales como el clima, topografía, y geología. Estas variables ambientales varían típicamente de manera irregular, con sitios cercanamente similares. De esta manera, si seleccionamos parcelas de bosque y maíz que están cercanas, las diferencias entre ellas, principalmente, se deberán al uso de suelo y no, a otros factores, lo que nos

permite eliminar las variables que “meten ruido” en el análisis. Entonces, el enfoque sería identificar y muestrear, por ejemplo, diez pares de sitios, donde cada par esté formado por parcelas de bosque y maíz cercanas, situadas a cada lado de un lindero de uso de suelo. Formalmente, cada par constituye un estrato de tamaño 2. Más de dos usos de suelo pueden incluirse en el diseño. Las ideas de diseño para experimentos de bloques incompletos son relevantes para seleccionar pares de usos de suelo similares.

Controlar la variabilidad mediante la reducción del área de estudio, muchas veces es la mejor solución. El área podría ser reducida, si se reduce el tamaño del sitio de muestreo, reduciendo naturalmente la heterogeneidad, lo que puede ser insatisfactorio porque también reduce la generalidad de los resultados. Si únicamente tomamos muestras en un área pequeña, entonces no existe una base para asumir que se han encontrado patrones ampliamente aplicables. Otras maneras de reducir el ámbito del sitio de estudio son:

No incluir todos los usos de suelo encontrados en el área de estudio, sino una selección que cubra un gradiente de intensidades de uso de suelo o que represente alguna transición típica en el uso de suelo.

Ajustarse a la definición de una clase de uso de suelo. Por ejemplo, en lugar de tomar un “campo de maíz” como uso de suelo, se podrá limitar la atención a campos de maíz que han sido cultivados continuamente durante los últimos diez años, que no han sido fertilizados en los últimos tres años y que son trabajados con azadón.

Evitar tomar muestras en sitios ambiguos, como aquellas que se encuentren cerca de linderos.

Mientras esto ayudará a detectar y medir el efecto de la intensidad de uso de suelo en la biodiversidad del suelo, pueden ser inconsistentes con los objetivos del inventario de las especies. Un compromiso entre los dos objetivos puede ser necesario. Esto es común en el diseño de proyectos y, en resumidas cuentas, no se puede esperar encontrar todo en un tamaño limitado de muestra.

ESQUEMA DE MEDICIÓN DE PUNTOS

Una vez localizados los puntos de muestreo, tiene que ser definido un protocolo de medición, lo que implica la necesidad de un muestreo adicional. El esquema básico

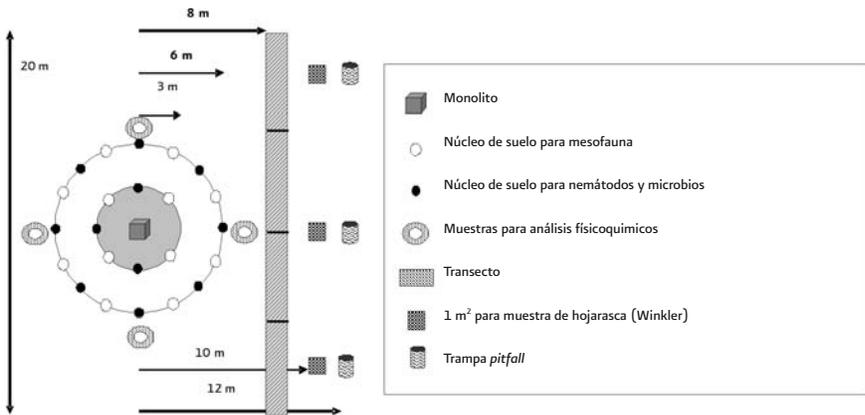
de muestreo por puntos adoptado por el CSM-BGBD se presenta en la Figura 2.3, que a la vez se complementa con la Tabla 2.1. Aunque el esquema de medición utilizado para el muestreo de grupos funcionales que son descritos por los procedimientos del proyecto alternativas de roza, tumba y quema (Swift y Bignell, 2001), es diferente de lo que fue propuesto por Swift y Bignell para adecuarse al enfoque basado en la cuadrícula. Por ejemplo, los pocos monolitos en cada punto de muestreo son compensados por el gran número de puntos de muestreo, que resulta en aproximadamente el mismo número de eventos de muestreo. No obstante, los resultados preliminares han indicado que con un pequeño monolito por punto de muestreo no todas las especies pueden ser capturadas. Si éste es el objetivo para llevar a cabo el muestreo, se prevén opciones adicionales para incluir monolitos más grandes.

Macrofauna: un solo monolito, trampas de caída (*pitfall*) y, por lo menos un transecto de 20 m son colocados en cada sitio de muestreo. El muestreo por transectos se amplía para incluir hormigas y escarabajos, en adición a las termitas. En un esquema alternativo adicional los monolitos pueden ser excavados para mejorar el muestreo de lombrices de tierra y se puede introducir un sistema simple para tomar muestras de termitas. Nótese que en las parcelas pequeñas, los sistemas de cultivo pueden estar altamente disecados o los terrenos son difíciles, por lo tanto, no es necesario que el transecto sea lineal. Un transecto puede tener un ángulo de 90 grados, y muestrear parcelas de forma irregular o para evitar arroyos, fuertes pendientes o rocas. Los árboles caídos deben incluirse en el transecto si estos quedan sobre la línea (Swift y Bignell, 2001).

Mesofauna: 12 extracciones de suelo tomadas en círculos concéntricos alrededor de un solo monolito a 3 y 6 metros de radio, y extraídas utilizando el método Berlese. Adicionalmente, las trampas *pitfalls* sin cebo abiertas durante un periodo de 24 horas sirven para coleccionar mesofauna y macrofauna que viven en la superficie. Las trampas *pitfalls* generalmente son apropiadas para hormigas, algunos escarabajos, algunos saltamontes, milpiés y arañas. Muestras de suelo extraídas con sacabocado por el método de Berlese contienen colémbolos, ácaros y en sitios húmedos enquitreidos.

Microfauna: muestreos con sacabocado de manera similar en 12 extracciones de suelo de dos círculos concéntricos, a 3 y 6 metros de radio del monolito. La "microfauna", principalmente se refiere a nematodos, aunque también a pequeños ácaros (y larvas de ácaros) extraídos de las muestras de suelo; por el método Berlese pueden cuantificarse.

Figura 2.3 Esquema de muestreo por puntos para toda la biota. El muestreo se puede ampliar si se usa uno o dos transectos para termitas, hormigas y escarabajos, mediante un muestreo casual para termitas (1 hora) y por monolitos adicionales para capturar más lombrices de tierra.



Microsimbiontes y hongos del suelo: muestreos de manera similar mediante 12 extracciones de suelo con sacabocado, puestas en dos círculos concéntricos alrededor de un solo monolito, a 3 y 6 metros de radio.

Parámetros físicos y químicos del suelo: cuatro extracciones de suelo con sacabocado puestas en un círculo de 6 metros de radio de un monolito. En el caso de estudios de co-ubicación, una extracción adicional de suelo puede tomarse de la pared exterior de la zanja del monolito (véase Capítulo 3, muestreo de macrofauna).

En un esquema alternativo (Figura 2.4) los usos de suelo pueden ser muestreados por una combinación de monolitos principales y subsidiarios, transectos de 50 metros, cuadrantes de hojarasca espaciadas y trampas *pitfalls*. El muestreo casual alrededor de los transectos puede ser empleado y también trampas Malaise colocadas para capturar insectos voladores mayores. El protocolo difiere de la propuesta anterior, en lo concerniente a los puntos del transecto, cuadros de hojarasca, trampas *pitfalls* y monolitos subsidiarios colocados en líneas paralelas de 50 m, con una separación lateral de 10 m. Este protocolo debe ser tomado básicamente como una extensión del propuesto anteriormente y se considera aplicable en donde se le dé más importancia al muestreo de todas las especies que existen dentro del área y en los casos donde la frecuencia de muestreo es baja (número de parcelas muestreadas) por las razones explicadas anteriormente. Estas modificaciones

resultan más adecuadas cuando se encuentran diferentes usos de suelo en todos los sitios.

CONSIDERACIONES PRÁCTICAS EN LA ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO DE CAMPO

La colecta de muestras o la medición directa en el campo deberían, en la medida de lo posible, realizarse de forma secuencial y durante una sola salida. En el caso de parámetros físicos y químicos del suelo que permanecen estables en el tiempo, el muestreo puede hacerse en un momento diferente. Lo anterior, por supuesto, no se aplica en el caso de características dinámicas del suelo, por ejemplo, el contenido de agua en el suelo.

Figura 2.4 Esquema alternativo para muestrear macrofauna, utilizando un transecto de 50 m.

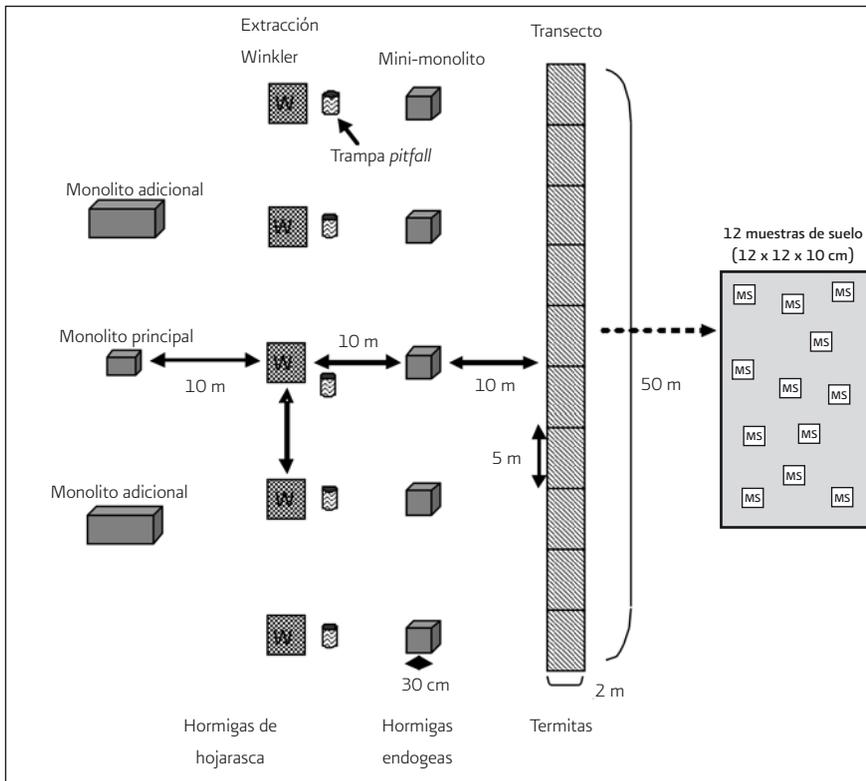


TABLA 2.1 GRUPOS DE ORGANISMOS DEL SUELO COLECTADOS UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS DE CAPTURA.

Símbolo del Método	Componentes de la diversidad/grupos de organismos del suelo							Suelo	Descripción
	Hormigas	Termitas	Escarabajos	Lombrices de tierra	Otra macrofauna	Nematodos	Microbios		
Trampa (pitfall) 	X	X	X		X			X	Trampas pitfall con cebo* - 3 trampas por punto de muestreo. Las trampas se deben quitar después de 48 horas en campo.
Transecto 	X		X						Transectos semi-cuantitativos 2 x 20 m uno por punto de muestreo, perpendicular a la pendiente
Trampa Winkler 	X	X	X		X			X	Trampas Winkler para muestras pequeñas de hojarasca (1 x 1 m) a lo largo del transecto, 3 Winkler por punto de muestreo
Embudo de Berlese 	X	X	X					X	Núcleos de suelo con hojarasca (3.5 x 3.5 x 5 cm), 12 submuestras por punto de muestreo (profundidad de 0-5 cm). Para mesofauna se hace una muestra compuesta (1er opción), o 4 muestras compuestas por 3 submuestras de cada cuadrante (segundo opción) o 3 muestras compuestas por 4 submuestras.
Varios 								X	Núcleos de suelo para microbios de 0-20 cm de profundidad sin hojarasca. En círculos a 3 y 6 m, del punto de muestreo, una muestra compuesta de 12 submuestras por punto de muestreo.

TABLA 2.1 CONTINUUA.

Símbolo del Método	Componentes de la diversidad/grupos de organismos del suelo							Suelo	Descripción
	Hormigas	Termitas	Escarabajos	Lombrices de tierra	Otra macrofauna	Nematodos	Microbios		
Monolito 	X	X	X	X	X			X	Monolito (25 x 25 x 30 cm), incluyendo hojarasca, una muestra por punto - método TSBF.
								X	Muestra de suelo, una muestra compuesta de suelo por al menos 4 submuestras para análisis físicos y químicos, profundidad 0-10; 10-20; 20-30 cm.

*Nota.- El cebo sugerido para las trampas *pitfall* es excremento de monos o de humanos, el cual es muy efectivo para extraer escarabajos coprófagos (Coleoptera) y, al mismo tiempo, no interfiere con la captura de escarabajos saprofíticos (Scarabaeidae, Aphodidae, Trogidae) y predadores (Sistiridae, Staphilinidae). El excremento de omnívoros, resulta más adecuado, en el caso de áreas de selva tropical porque los omnívoros predominan en estos ambientes

La colecta de muestras de los principales grupos funcionales de organismos del suelo, requiere de la colaboración de mucha gente en cada punto de muestreo, con el riesgo de lastimar el cultivo en pie, al igual que afectar el inventario, especialmente de aquellos organismos con alta motilidad o sensibles a la intromisión humana. Por ejemplo, las lombrices de tierra epígeas y algunos tipos de termitas comedoras de tierra son sensibles al disturbio, y especialmente a las pisadas, por lo que se alejarían rápidamente. Por lo tanto, es importante reducir el número de personas involucradas en la colecta de las muestras, aunque se necesita un número suficiente de manos para poder manejar y procesar las muestras.

Durante el entrenamiento de técnicos y asistentes de campo, es necesario prestar atención a los riesgos que pudieran surgir en cada grupo específico de organismos de suelo. El riesgo de contaminación cuando se trata de microorganismos debe ser entendido y la importancia de utilizar procedimientos adecuados para evitar la contaminación debe ser enfatizada, especialmente en las personas inexpertas. El mismo principio rige cuando existe la posibilidad de que dichos organismos escapen de los sitios de muestreo, como consecuencia de una severa perturbación.

Otra preocupación es el gran volumen de suelo que será colectado durante el muestreo y la necesidad de reducir dicho volumen para transportarlo. Desde este punto de vista, la extracción de especímenes de las muestras se hace mejor en, o cerca, del sitio de muestreo. También, en el sitio de muestreo se deben agrupar todas las muestras y extraer sub-muestras para su posterior análisis.

El tiempo y la temperatura a la que se almacenan las muestras juegan un papel importante, dado que muchos organismos del suelo pueden morir a temperatura ambiente, en la superficie del suelo, o cuando son guardados en bolsas o contenedores durante unas cuantas horas. Para poder evitar dichos riesgos es importante identificar una instalación local adecuada antes de colectar las muestras o, hacer la extracción inmediata *in situ* de los especímenes. En algunas ocasiones, por ejemplo, el embudo de Berlese para la mesofauna y de Winkler para la extracción de hormigas y escarabajos de la hojarasca, pueden instalarse en el campo para su uso inmediato; en otros casos, cuando los organismos necesitan ser cultivados *in vitro* o cuando las propiedades del suelo necesitan ser determinadas, es necesario disponer de un transporte rápido para su traslado hacia el laboratorio. Bajo ninguna circunstancia las muestras deberán permanecer bajo el sol, ni aun cuando el protocolo de extracción requiera de un secado final de la materia. Otros detalles sobre las precauciones a tomar en cuenta y consejos

sobre la logística general, se pueden encontrar en los capítulos que tratan grupos y métodos específicos.

MUESTREO EN EL PROYECTO CSM-BGBD

La jerarquía de muestreo

En el proyecto fueron seleccionadas áreas de siete países tropicales, con el propósito de evaluar la pérdida de biodiversidad del suelo con el incremento en la intensidad del uso de suelo. Los sitios se localizaron en las principales regiones biogeográficas de los trópicos, desde la selva tropical húmeda Amazónica hasta la selva montañosa del Himalaya, en la India; áreas que presentan una biodiversidad global importante. Cada sitio incluyó un intervalo de usos de suelo desde selvas prístinas relativamente no perturbadas, hasta tierras agrícolas sometidas a uso intensivo, para determinar tendencias comunes, que puedan ser observadas en el cambio de la biodiversidad del suelo en relación con la intensidad del uso del suelo. El uso de métodos estándares de muestreo en los países y sitios de estudio, permite hacer comparaciones entre los sitios.

Se adoptó un enfoque para el muestreo dentro de los sitios que hace uso del muestreo por medio de ventanas. Una ventana es (usualmente un rectángulo) una parcela de tierra que incluye en el estudio varios usos de suelo locales y se consideran “representativos” de los sitios de estudio. Típicamente, las ventanas miden entre 2 y 5 km²; estas ventanas de muestreo varían en tamaño y número debido a la configuración del uso del suelo en cada sitio, y sólo se presentó un caso donde el acceso fue problemático. Por ejemplo, se utiliza una ventana más grande para incluir los usos de suelo relevantes en el área y hasta seis ventanas más pequeñas se distribuyen dentro del área para los diferentes usos de suelo requeridos.

Una cuadrícula regular (con espacios variables, véase a continuación) se utiliza para identificar un conjunto de posibles puntos de muestreo dentro de cada ventana; los puntos corresponden a las intersecciones de las líneas en la cuadrícula. El muestreo de cuadrícula se usó por las razones descritas anteriormente, eficiencia estadística y para racionar el trabajo de campo. Además, el inventario es de naturaleza exploratoria, sin tomar en cuenta la hipótesis general formulada, pues quedan pendientes las siguientes preguntas: ¿cuáles de los factores que determinan las prácticas intensivas de uso de suelo influyen en la distribución y riqueza de la biota del suelo? y, ¿a qué escala los patrones de distribución espacial se manifiestan? Este

enfoque es similar al usado para el proyecto de *BioAssess*, financiado por la Unión Europea, cuyo objetivo, similar al de éste proyecto, fue evaluar la biodiversidad en función de la intensidad del uso del suelo en paisajes agrícolas (véase Ponge *et al.*, 2003; Federoff *et al.*, 2005).

La biodiversidad del suelo se muestrea en el nivel de parcela (punto de muestreo o sitio). La cuadrícula define una serie de parcelas, con un objetivo de cerca de 100 a 200 parcelas por ventana. La parcela es un área de, por lo menos, 25 x 25 m determinada por el área mínima requerida para coleccionar todas las muestras necesarias y realizar su medición, tal y como se describió anteriormente. El principio de co-ubicación es adoptado para análisis de muestras físicas y químicas del suelo y para los inventarios de la biodiversidad del suelo. Al mismo tiempo las ventanas permiten comparar la biodiversidad del suelo entre los componentes del paisaje.

Localización y definición de las ventanas de muestreo y cuadrícula

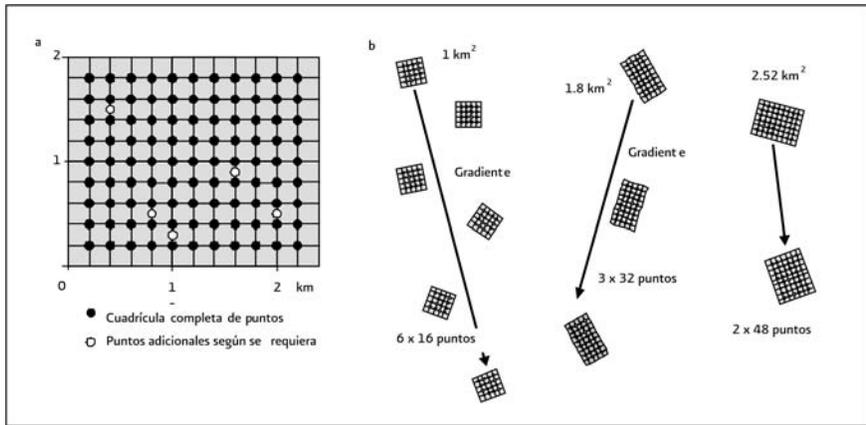
La posición de las ventanas dentro del sitio de estudio se hace de tal modo que abarque los diferentes usos de suelo. Generalmente, una ventana no puede abarcar los diferentes usos del suelo, por lo que son necesarias otras ventanas más pequeñas. La Figura 2.5 describe las distintas configuraciones utilizadas. La Figura 2.5a ilustra el uso de una ventana de 9 x 11 puntos de muestreo (además de algunos puntos adicionales de muestreo). La figura 2.5b ilustra el uso de 6, 3 y 2 ventanas separadas. En el caso donde se usan seis ventanas separadas, una ventana medirá 1 km², dependiendo de la distancia entre los puntos de la cuadrícula.

En sitios caracterizados por fuertes pendientes se esperaría que el gradiente del uso del suelo esté orientado en la misma dirección, y las ventanas estarán entonces localizadas a lo largo del gradiente (Figura 2.5b). En los linderos de la selva en los trópicos, frecuentemente se observa que el patrón de distribución de usos de suelo refleja un gradiente de intensidad de uso de suelo, con un uso más intensivo a mayor distancia de la selva. En tales casos, las ventanas de muestreo se localizan a lo largo de tal gradiente. Se necesita, por lo tanto, contar con suficientes conocimientos de la región antes de seleccionar los sitios de muestreo.

Cuando algunos gradientes no son obvios, la selección de las ventanas deberá cubrir dos o tres de los usos de suelo más importantes y, por tanto, también las transiciones observadas con mayor frecuencia de un tipo a otro tipo de uso de suelo. Por ejemplo, en los márgenes del bosque puede darse la transición de bosque a pastizal, bosque a tierras de cultivo o bosque a grandes plantaciones, en donde

una ventana cubre cada transición típica de uso de suelo. Esto permitirá un análisis comparativo de transiciones de uso de suelo (por medidas relativas), mientras minimiza los cambios en la biodiversidad del suelo que surgen de los diferentes usos, variaciones topográficas o climáticas, antes que un cambio de uso de suelo *per se*. De esta forma, se introduce un elemento de replicación.

Figura 2.5 Ejemplos de diferentes configuraciones de ventanas de muestreo. a) cuadrícula completa, con puntos de muestreo adicionales, según se requiera; b) ilustración de la división de una cuadrícula entre seis, tres y dos ventanas, dispuestas a lo largo del gradiente.



Para la selección de las ventanas de muestreo se utilizaron fotos aéreas o imágenes de satélite de alta resolución. Mapas detallados de uso de suelo y de vegetación también son adecuados para este propósito. Cuando se encuentran disponibles mapas digitales de uso de suelo, el área ocupada por cada uso de suelo, dentro de una ventana definida puede ser determinada utilizando *software* de Sistemas de Información Geográfica (SIG) estándar, lo que facilitará la selección de las ventanas. Cuando únicamente están disponibles materiales análogos, se hace una selección manual por interpretación visual, utilizando un papel traslúcido sobre la fotografía.

Número de parcelas de muestreo y tamaño de la cuadrícula

El número total de puntos de muestreo por área de referencia se mantiene fijo entre 100 y 120. Lo anterior se obtiene mediante varias configuraciones de ventana(s)

de muestreo y las dimensiones de las cuadrículas. Se añaden puntos de muestreo donde el uso de suelo es altamente variable. El número total de puntos de muestreo concuerda con otras estrategias de muestreo propuestas en ejercicios similares de evaluación de la biodiversidad. Por ejemplo, el proyecto *BioAssess* (Ponge *et al.*, 2003) recomienda un número similar de puntos de muestreo, y el procedimiento recomendado por el proyecto ASB (Swift y Bignell, 2001) tendrá un esfuerzo de muestreo comparable. En este último, cada uso de suelo es evaluado en, por lo menos, un transecto de 40 x 5 m, del cual un mínimo de cinco monolitos son cavados para muestrear la macrofauna y cinco muestras conjuntas para los microsimbiontes, suponiendo que existan entre seis y siete usos de suelo distintos por cada área de referencia (correspondientes a seis o siete clases de usos de suelo generalmente definidos en el sistema de clasificación de usos de suelo) donde cada uso de suelo es muestreado por tres transectos, dando un total de 90 a 105 monolitos muestreados (y el mismo número de muestras agrupadas para evaluar los microsimbiontes) aproximadamente igual al número de puntos en la cuadrícula, descritos anteriormente. La principal diferencia con el enfoque de muestreo de cuadrícula, es que únicamente se toma un monolito y una muestra agrupada para los microsimbiontes por parcela. Mientras el tamaño de muestra sigue siendo más o menos igual en los transectos y cuadrículas, el esfuerzo de muestreo promedio probablemente varía.

En este sentido Swift y Bignell (2001) argumentan, en parte por consideraciones logísticas, que para incrementar la confiabilidad de los datos del esquema basado en transectos, el número de puntos de muestreo deberá incrementarse de 5 a 8 por transecto (es decir, más puntos en la misma parcela), con un transecto extendido en el caso de algunos grupos (por ejemplo, termitas). En un muestreo basado en transectos la idea de replicación recomendada por Swift y Bignell (tres transectos por cada uso de suelo) casi nunca se logra; otra opción es ensamblar de una manera sinóptica por combinación de transectos a lo largo de diferentes años o en proyectos no relacionados (ej. Eggleton *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003).

Los resultados del inventario del proyecto CSM-BGBD indican que es necesario un esfuerzo mínimo de muestreo de 100 a 120 puntos para poder capturar la mayoría de las especies dentro del sitio, en el caso de por lo menos algunos de los grupos funcionales (ej. termitas y hormigas). Con 100 a 200 puntos por área de referencia generalmente se llega al punto donde la curva de acumulación de las especies para grupos de macrofauna es asintótica. La captura adicional de especies requiere de un esfuerzo de muestreo considerable. De esta manera, el diseño

de muestreo se ajusta a los objetivos del inventario del área de estudio, en lo que concierne a la evaluación de la diversidad de especies. En números pequeños o en una distribución irregular de puntos de muestreo en los diferentes usos de suelo, normalmente no todas las especies son capturadas y hará más difícil demostrar las diferencias en biodiversidad del suelo entre los tipos de usos de suelo que normalmente se caracterizan por una alta variabilidad en la riqueza de especies.

La colecta de muestras rara vez es el paso que limita la evaluación de la biodiversidad porque la extracción, identificación y catalogación de especímenes son los pasos que requieren mayor tiempo en el proceso (Lawton *et al.*, 1998). La experiencia del proyecto CSM-BGBD indica que el procesamiento de 100 a 120 muestras es viable con los recursos generalmente disponibles, pero aun así se requiere de una campaña organizada en el campo y de instalaciones establecidas para poder procesar y analizar las muestras. Si la capacidad para procesar y analizar esta cantidad de muestras no está disponible, el procedimiento correcto para reducir el número total de puntos de muestreo deberá ser estimado, basándose en otros datos o en un estudio piloto. El número de muestras requeridas por uso de suelo deben ser representativas de la biodiversidad del suelo presente y entonces, restringir el número de usos de suelo de manera que el esfuerzo total sea compatible con la capacidad de procesamiento. Reducir el número de puntos de muestreo por categoría de uso de suelo mientras se mantiene el número de categorías de uso de suelo investigado puede comprometer el objetivo de obtener resultados estadísticamente verificables.

Número de puntos de muestreo por categoría de uso de suelo

Con seis o siete tipos de uso de suelo en cada área determinada, un promedio alrededor de 15 puntos por clase de cobertura de suelo resultan de muestrear la cuadrícula. Con menos categorías de uso de suelo presentes, el número de puntos por categoría de uso de suelo aumenta.

Se le da prioridad al tipo de agricultura de subsistencia a la hora de incrementar el número de muestras porque es precisamente en esta categoría dónde se espera que ocurra una mayor variación debido al manejo, historia, etc. Dado el alto nivel de variación en las medidas de los componentes de la biodiversidad del suelo, es importante considerar el número mínimo de puntos requeridos para cada categoría de uso de suelo. Se aconseja hacer una prueba piloto para informar el diseño de muestreo; si esta prueba confirma alta variabilidad en la biodiversidad del suelo dentro de las

categorías de uso de suelo, entonces se hace un ajuste de la definición de clases de uso de suelo. Esto implica adoptar un nivel más alto de detalle en el sistema de clasificación de uso de suelo y, posteriormente, seleccionar las clases de uso de suelo que cubren un claro gradiente en intensidad de usos de suelo, de acuerdo con los principios detallados en “Hablando de variabilidad” (arriba). La definición de un sistema de clasificación de uso de suelo se detalla en el Capítulo 11.

Adaptación del enfoque de muestreo a condiciones de campo

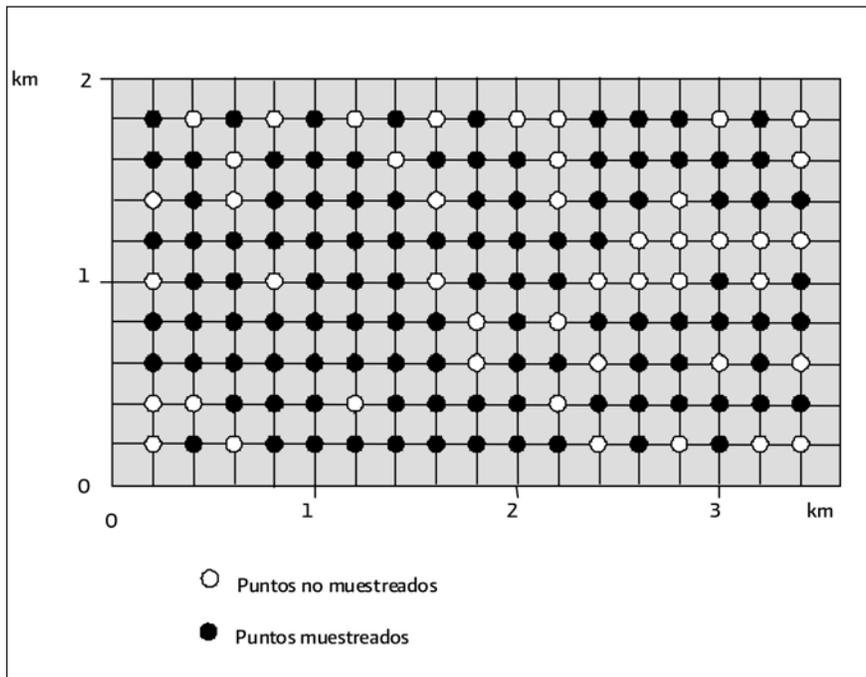
Hay dos estrategias disponibles para asegurar una representación de los usos de suelo y clases de cobertura en el muestreo. Una estrategia es usar una “cuadrícula estratificada” según lo ilustrado en la Figura 2.6. Para este propósito, se define una cuadrícula mayor (resaltando el número de intersecciones), de tal manera que se cumpla el criterio para un mínimo número de puntos de muestreo en cada uno de los tipos de uso de suelo. Posteriormente, se aplica un procedimiento no-sesgado para restar un número de puntos que permitan contrarrestar el incremento en el número total de puntos de muestreo que resulta de ampliar la cuadrícula, mientras se cumplen los requerimientos para el número mínimo de puntos de muestreo para cada categoría de uso de suelo. Este procedimiento permitirá eliminar los puntos que caigan en tipos de uso de suelo no especificados.

De la misma manera, se puede partir de una cuadrícula vacía (que únicamente contenga posibles puntos de muestreo), con el propósito de seleccionar aleatoriamente puntos de muestreo para cada categoría de uso de suelo, de forma separada hasta que se cumpla con el requerimiento del número mínimo de puntos de muestreo. Esta estrategia implica incluir ventanas de muestreo irregulares. Para poder seleccionar o eliminar sitios de muestreo (parcelas) es necesario conocer los usos de suelo en cada punto de la cuadrícula y se requiere de un inventario de uso de suelo previo al muestreo de la biodiversidad del suelo.

La segunda opción es seleccionar puntos adicionales dentro de las ventanas entre los puntos existentes de la cuadrícula para aquellas categorías de uso de suelo que están siendo muestreadas. Esta opción se puede observar en la Figura 2.5a, donde la distancia mínima entre puntos necesita ser respetada. Aunque la inserción de puntos adicionales es conveniente, deberán hacerse algunos intentos para aleatorizar la selección de los puntos originales para ser divididos en dos.

El enfoque de la cuadrícula asume un acceso libre al terreno o parcela donde se localizan los puntos de muestreo. Cuando éste no es el caso, se necesita una

Figura 2.6 Ilustración de los puntos de muestreo seleccionados mediante una cuadrícula estratificada.



estrategia de muestreo alterna. Por ejemplo: en un área determinada en México, el acceso a las tierras de los agricultores estuvo restringida. En este caso las tierras seleccionadas fueron aquéllas que pertenecían a agricultores que sí permitieron el acceso y se adoptó un patrón específico para muestrear dentro de estas tierras, en lugar de utilizar una cuadrícula regular que cubriera un área mayor. En el área determinada en La Amazonia en Brasil, debido al aislamiento de las comunidades, de una a tres ventanas fueron colocadas en cada comunidad disponible, colocando una cuadrícula fija dentro de dichas ventanas.

Distancia entre los puntos de muestreo

La distribución de los organismos del suelo puede reflejar gradientes, por ejemplo, aquéllos de carbono orgánico y prácticas de cultivo. Los patrones de distribución de los organismos del suelo puede correlacionarse con la topografía, con

los parches de vegetación, con gradientes de recursos del suelo, o bien, con la ubicación de árboles individuales. Por otro lado, la distribución y agrupación de organismos de suelo también son gobernadas por fuerzas intrínsecas de procesos poblacionales tales como dispersión, reproducción y competencia (Lavelle y Spain, 2001). Existen varias teorías para explicar la riqueza extremadamente alta de las comunidades del suelo y el bajo grado de especialización en recursos. En el caso del proyecto de la biodiversidad del suelo, con muchos grupos diferentes de organismos del suelo estudiados, la investigación de la distribución de patrones específicos no representa un objetivo deseado, razón por la que no fueron considerados esquemas de muestreo adecuados para llevar a cabo un análisis de la distribución espacial. Sin embargo, el muestreo en cuadrícula permite examinar patrones espaciales a escalas entre la distancia inter-muestra y el tamaño de la cuadrícula.

En la literatura se pueden encontrar varios ejemplos de la estructura espacial de la biota de suelo sobre distancias de menos de un centímetro hasta de cientos de metros en el campo, dependiendo de los organismos implicados. Ettema y Wardle (2002) mencionan que la biomasa microbiana y los colémbolos son espacialmente dependientes en intervalos de más de 200 m, que las termitas siguen patrones espaciales en un intervalo de hasta 330 m y que la distribución de especies de nematodos muestra tamaños de parches entre 6 a 80 m. También se registra una distribución parchada en una escala miniatura de centímetros a metros, anidadas en estructuras más grandes.

Una distancia de 200 m parece aceptable porque permite un área relativamente mayor de muestreo a través de la cuadrícula y es probable que refleje los usos de suelos más dominantes en la muestra, al mismo tiempo permite, en la mayoría de los casos, atravesar de un punto a otro. Al mismo tiempo reduce la dependencia espacial de las observaciones para la mayoría de los principales grupos de organismos del suelo, tales como las lombrices de tierra. No obstante, en el caso de paisajes altamente fragmentados, con parcelas muy pequeñas (menos de 0.5 ha) y donde no es posible atravesar (ej. vegetación secundaria muy densa dentro de parcelas barbechadas), se pueden reducir los espacios en la cuadrícula. Por estas razones, los espacios en la cuadrícula fueron reducidos en el área determinada en Brasil, en la Amazonia, a 100 m; si las parcelas individuales miden más de dos a cuatro hectáreas, se debe considerar aumentar la distancia entre los puntos.

Inventario de uso del suelo y caracterización del sitio

La hipótesis central plantea que la mayor variación en la biodiversidad del suelo está asociada con la diferencia en la intensidad de usos de suelo, descrita a nivel de las principales categorías de uso de suelo. Existen un número de factores interrelacionados: bióticos y abióticos (ej. diversidad de plantas, materia orgánica del suelo) y características de manejo (tipo de labranza, uso de químicos, etc.) que afectan la distribución de organismos del suelo y se asume que las principales categorías de uso de suelo proporcionan una diferencia significativa, en términos de los factores que determinan la biodiversidad del suelo.

Sin embargo, las condiciones bióticas y abióticas, así como las características de uso y manejo del suelo pueden variar considerablemente entre regiones, la diversidad del suelo es inventariada independientemente a lo largo de un gradiente de intensidades de usos de suelo para cada área seleccionada. Al mismo tiempo, la información sobre la precipitación anual, temperatura y humedad media, días de lluvia, duración de secas y la precipitación acumulada hasta la fecha de muestreo, deberían registrarse para la ventana e incluso para el área seleccionada, junto con la altitud, pendiente y aspecto. La historia del sitio, con referencia especial al uso del suelo también es importante de conocer (aunque no siempre se cuenta con este dato).

Debido a que se sabe muy poco sobre la importancia relativa de los factores antes mencionados, asumir que una categoría de uso del suelo está en una escala correcta para acomodar su variación puede ser incorrecto. Es posible que la variabilidad en abundancia y diversidad de organismos del suelo dentro de una categoría de usos de suelo pueda ser mayor que la variabilidad entre categorías de uso de suelo, especialmente en sistemas tan diversos como los representados en los trópicos.

Por lo tanto, y debido a que las características completas del sitio no pueden ser obtenidas solamente por la apariencia del uso del suelo, lo indicado será incluir una descripción detallada de uso y cobertura del suelo, y de las características del suelo, como parte del proceso del inventario, a fin de permitir un análisis completo de los datos para identificar los parámetros que explican la variabilidad en la biodiversidad del suelo. La definición de clases de uso de suelo resulta importante y se discute en el Capítulo 11 de este manual. El conjunto básico de las propiedades físicas y químicas del suelo debería incluir densidad aparente, textura (la proporción arcilla/arena/limo), pF (tensión de humedad del suelo), pH, C y N total, cationes

intercambiables, P, CIC, Al^{3+} y H^+ . Muestras de suelo son tomados de suelos no perturbados, pero inmediatamente adyacentes a la zanja de cada monolito (la zanja exterior probablemente sea el mejor lugar), puesto que de esta manera surge la posibilidad de correlacionar las propiedades del suelo con la presencia o ausencia de un taxa en particular y grupos funcionales (véase Anderson e Ingram, 1993).

Una descripción de los sitios puede ser completada por el tipo de vegetación. La diversidad y abundancia de especies de leguminosas son de particular importancia en relación con la presencia de las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. Además, características como la altura media del dosel, el porcentaje de cubierta vegetal, área basal, cobertura dominante/abundancia de flora en el nivel del suelo, acumulación y abundancia de hojarasca, especies de plantas y la riqueza de géneros, ayudan a elegir sitios a lo largo de un gradiente de diversidad botánica que tiene alguna relación con sus posiciones actuales en las cronosecuencias e intensidades de perturbaciones. El Capítulo 11 proporciona más detalles sobre los requerimientos respecto de usos de suelo específicos. Para el muestreo de otras variables relacionadas con la caracterización del sitio, ver Anderson e Ingram (1993).

Épocas de muestreo

Los organismos del suelo responden a cambios estacionales, y los resultados del inventario de la riqueza de especies y abundancia (relativa) mostrarán marcadas diferencias entre las épocas, dependiendo de los métodos utilizados. Respecto de hongos micorizógenos arbusculares, por ejemplo, cuando el método depende del conteo e identificación de esporas, la época seca será la más apropiada para muestrear. La producción de esporas responde a la fenología de las plantas y, en el caso de cultivos anuales las esporas son más abundantes durante la época seca, debido a la senescencia de las raíces, lo que puede ser diferente, por ejemplo, en áreas de bosque. En los casos de hongos fitopatogénos y hongos ectomicorrízicos, la evolución de las estructuras y ciclos reproductivos (como la formación de esporocarpos) se sincronizan con los cambios estacionales que ocurren dentro del hospedero y son mejor observados durante y hacia finales de la época de lluvias. También, la actividad de las lombrices de tierra es mayor al final de la época de lluvias (Tondoh y Lavelle, 2005). Idealmente, los inventarios deberían elaborarse durante la época de lluvias y también en la época de seca. Sin embargo, en la práctica, no siempre suele ser factible; por esta razón se hace el muestreo al final de la época de lluvias

con la opción de tomar muestras adicionales durante la época de secas. Lo último puede realizarse con el objetivo específico de investigar cambios temporales en la biodiversidad del suelo.

REFERENCIAS

- Anderson, J. M. e Ingram, J. S. I. (1993) *Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods*, 2nd edition, CAB International, Wallingford.
- Cochran W. G. (1977) *Sampling Techniques*, 3rd edition, Wiley, New York.
- Davies, R. G., Eggleton, P., Jones, D. T., Gathorne-Hardy, F. y Hernandez, L. (2003) 'Evolution of termite functional diversity: Analysis and synthesis of local ecological and regional influences on local species richness', *Journal of Biogeography*, vol 30, pp. 847–877.
- Eggleton, P., Bignell, D. E., Hauser, S., Dibog, L., Norgrove, L. y Madong, B. (2002) 'Termite diversity across an anthropogenic disturbance gradient in the humid forest zone of West Africa', *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol 90, pp. 89–202.
- Ettema, C. y Wardle, D. A. (2002) 'Spatial soil ecology', *Trends in Ecology and Evolution*, vol 17, pp177-183.
- Federoff, E., Ponge, J-F, Dubs, F., Fernández-González, F. y Lavelle, P. (2005) "Small-scale response of plant species to land-use intensification", *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol 105, pp. 283–290.
- Ford, E. D. (2000) *Scientific Method for Ecological Research*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gregoire, T. G. y Valentine, H. T. (2007) *Sampling Strategies for Natural Resources and the Environment*, Chapman and Hall/CRC Press, London.
- Kenkel, N. C., Juhfisz-Nagy, P. y Podani, J. (1989) 'On sampling procedures in population and community ecology', *Vegetatio*, vol 83, pp. 195–207.
- Lavelle, P. y Spain, A. V. (2001) *Soil Ecology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Lawton, J. H., Bignell, D. E., Boulton, B., Bloemers, G. F., Eggleton, P., Hammond, P. M., Hodda, M., Holt, R. D., Larsen, T. B., Mawdsley, N. A., Stork, N. E., Srivastava, D. S. y Watt, A. D. (1998) 'Biodiversity inventories, indicator taxa and effects of habitat modification in tropical forest', *Nature (Lond)*, vol 391, pp. 72–76.
- Pedigo, L. P. y Buntin, G. D. (eds) (1993) *Handbook of Sampling Methods for Arthropods in Agriculture*, CRC, New York.
- Peterson, D. L. y Parker, T. (eds) (1998) *Ecological Scale: Theory and Applications*, Columbia University Press, New York.

- Ponge, J. F., Gillet, S., Dubs, F., Federoff, E., Haese, L., Sousa, J. P. y Lavelle, P. (2003) 'Collembolan communities as bioindicators of land use intensity', *Soil Biology & Biochemistry*, vol 35, pp. 813–826.
- Southwood, T. R. E. y Henderson, P. A. (2000) *Ecological Methods*, 3rd edition, Blackwell Science, Oxford.
- Stein, A. y Ettema, C. (2003) 'An overview of spatial sampling procedures and experimental design of spatial studies for ecosystem comparison', *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol 94, pp. 31–47.
- Swift, M. y Bignell, D. E. (eds) (2001) *Standard Methods for the Assessment of Soil Biodiversity and Land-use Practice*, International Centre for Research in Agroforestry, South East Asian Regional Research Programme, ASB-Lecture Note 6B, Bogor, Indonesia, www.worldagroforestrycentre.org/SEA/Publications.
- Thompson, S. K. y Seber, G. A. F. (1996) *Adaptive Sampling*, Wiley, New York.
- Tondoh, E. J. y Lavelle, P. (2005) 'Population dynamics of *Hyperiodrilus africanus* (Oligochaeta, Eudrilidae) in Ivory Coast', *Journal of Tropical Ecology*, vol 21, pp. 493–500.
- Urban, D., Goslee, S., Pierce, K. y Lookingbill, T. (2002) 'Extending community ecology to landscapes', *Ecoscience*, vol 9, pp. 200–202.
- Webster, R. y Oliver, M. A. (1990) *Statistical Methods in Soil and Land Resource Survey*, Oxford University Press, Oxford.
- Wessels, K. J., Jaarsveld, A. S. van, Grimbeek, J. D. y van der Linde, M. J. (1998) 'An evaluation of the gradsect biological survey method', *Biodiversity Conservation*, vol 7, pp. 1093–1121.

CAPÍTULO 3

Macrofauna

David E. Bignell, Reginaldo Constantino, Csaba Csuzdi,
Agus Karyanto, Souleymane Konaté, Julio Louzada,
Francis-X. Susilo, Jérôme Ebagnerin Tondoh y Ronald Zanetti

INTRODUCCIÓN

Este capítulo describe los métodos para realizar el inventario de la macrofauna del suelo; el grupo macrofauna incluye aquellos animales del suelo que miden más de un centímetro de largo, o que tienen una anchura o diámetro de más de 2 mm. Una diversidad de organismos de suelo se incluye en esta categoría (capítulo 1), aunque éste se concentra en los grupos más significativos: lombrices de tierra, termitas, hormigas y escarabajos. Las lombrices de tierra son, probablemente, los invertebrados más importantes en el suelo de regiones templadas; sin embargo, en ambientes tropicales, predominan las termitas y las hormigas. Mucha macrofauna desempeña un importante papel en los ecosistemas del suelo, como ingenieros del suelo, que habitan especialmente en ambientes tropicales, e influyen de manera notable en las propiedades físicas y químicas de los suelos, sobre todo, en la creación de macroporos y en la transformación y redistribución de materia orgánica. Otros son trituradores que deshacen la materia orgánica y un buen número de estos grupos son macropredadores. Debido a su importante papel en los procesos del ecosistema y a su sensibilidad ante condiciones ambientales, los grupos de macrofauna frecuentemente son utilizados o propuestos como indicadores de la calidad biológica del suelo, por tanto, se consideran un componente determinante de la biota del suelo, indicativos de la biodiversidad de suelo y de los efectos del cambio de uso y prácticas de manejo del mismo. Además, debido a su biomasa,

generalmente alta, forman un importante componente de la red alimenticia en el suelo. Para poder contar con datos de diversidad y abundancia de lombrices de tierra, que sirvan como indicadores para monitorear el cambio de efecto de uso de suelo, se requiere de métodos estándares en el muestreo para diversidad, abundancia y biomasa. En este capítulo se describen métodos propuestos para realizar un inventario de macrofauna, tal y como fueron aplicados en el proyecto CSM-BGBD. Se entiende que los métodos propuestos son aplicados en ambientes tropicales; sin embargo, podrán ser utilizados más ampliamente.

En el capítulo 2, se explica que no existe un sólo método para llevar a cabo un inventario de un grupo específico de macrofauna. Generalmente, algunos grupos representativos de macrofauna específica son capturados, utilizando cualquiera de los métodos enlistados en el capítulo 2; por lo tanto, este capítulo se estructura de acuerdo con el método utilizado y no tanto en función del grupo funcional. No obstante, cada uno de los métodos descritos es idóneo para un grupo en particular: los monolitos son especialmente escogidos para el inventario de lombrices de tierra; el método de transecto es más adecuado para un inventario de termitas; y la extracción *Winkler* es el método más idóneo para la captura y extracción de hormigas de muestras de hojarasca, mientras que las trampas *pitfall* con cebo son apropiadas para la captura de escarabajos, por ende, en cada una de las siguientes secciones que describe un método en particular, cuyo énfasis se concentra en un grupo específico de organismos asociados y, al mismo tiempo, en la generalidad de la macrofauna.

Como en el caso de otros grupos de biota de suelo, el punto de partida de desarrollo de los protocolos han sido los procedimientos de Anderson e Ingram (1989, 1993) consolidados y mejorados por Swift y Bignell (2001), los que generalmente se refieren como métodos "TSBF". Éstos están basados en monolitos de suelo y, en el caso de termitas, en un transecto corto (20-40 X 2m) al que ahora han sido añadidas trampas *pitfall* (principalmente para escarabajos) y otras guías para muestreo casual. Un avance mayor consiste en utilizar el principio de transecto para hormigas y escarabajos, con la extracción de los insectos de los marcos de hojarasca por el método *Winkler* (Bestelmeyer et al. 2000). Nuevos esquemas son propuestos en el diseño de monolitos para mejorar el muestreo de lombrices de tierra; el hecho de que se pueda dedicar un capítulo entero al muestreo de macrofauna, y no simplemente tres páginas que fueron impresas en los métodos originales "TSBF", demuestra cómo ha crecido durante los últimos años nuestra percepción de la importancia de estos organismos.

INVENTARIO DE MACROARTRÓPODOS DE SUELO, HOJARASCA Y LOMBRICES DE TIERRA EN PARTICULAR, UTILIZANDO MONOLITOS DE SUELO

Macroartrópodos de hojarasca y de suelo. Monolito TSBF

Los procedimientos generales, son dictados por Anderson e Ingram (1993), con la adición de trampas *pitfall* (Swift y Bignell, 2001) y las extracciones con trampas Winkler (Bestelmeyer *et al.*, 2000), junto con monolitos extraídos del suelo, con dimensiones de 50 x 50 x 20 cm de profundidad para lombrices de tierra. Para la discusión del número y posicionamiento de monolitos, véase el capítulo 2. Se utiliza un transecto adicional de 20 x 2 m para muestrear las termitas. Este transecto también puede ser utilizado para hormigas y escarabajos, aunque es mejor si se muestrea la hojarasca delimitada por marcos dispuestos en una línea paralela.

Primero se coloca un marco de 25 x 25 cm para marcar la posición del monolito y cualquier hojarasca o madera dentro de él es removida e introducida en una charola (Figura 3.1a y 3.1b). Se aísla el monolito utilizando una pala a unos pocos centímetros fuera del marco y luego se cava una zanja a su alrededor de 25 cm de ancho y 30 cm de profundidad, aislando el monolito como un pilar no perturbado (Figuras 3.1c y 3.1d). En una variante del método, todos los invertebrados mayores de 10cm de largo, excavados de la zanja y la hojarasca pueden ser colectados; éstos, en su mayor parte, serán milpiés y lombrices de tierra con bajas densidades de población, pero que representan una biomasa importante. Su abundancia y biomasa podrán ser calculadas con base en las muestras de 0.50 m², es decir, la anchura aproximada del monolito más dos anchuras de zanja. Se divide el bloque del monolito en tres capas, de 0-10 cm, 10-20 cm y 20-30 cm; esto se puede hacer de manera sencilla, utilizando un machete o *parang* tomado de forma horizontal y agarrado por ambos lados. Se revisa manualmente la hojarasca y cada capa de monolito por separado, preferentemente en el lugar y bajo sombra. Si no hay mucho tiempo o si la luz es insuficiente (colectar en selva cerrada es difícil porque la luz disminuye muy temprano), hay que meter la muestra en un bote de 19 L y llevarla al laboratorio. La muestra de suelo en botes se debe guardar alejada del sol directo y deberá ser revisada antes de 24 horas. Para revisar el suelo es conveniente utilizar la superficie de una mesa grande de campo para llevar a cabo la extracción, de manera que puedan trabajar varios asistentes en la misma muestra de suelo o en muestras diferentes. En el caso de la hojarasca, una charola de plástico grande de cocina, con un reborde, sirve como un buen recipiente para la

revisión. Las hormigas pueden ser extraídas tomando un puñado de suelo, pasándolo a través de un tamiz de malla grande, de 5 mm, en una charola. El tamiz retiene las hormigas que pueden ser aspiradas. Se diseccionarán los pedacitos de madera en diferentes piezas para ver si hay termitas, hormigas o escarabajos; las pequeñas ramas deberán romperse y ser golpeadas en la charola para que se desprenda cualquier insecto que contengan. Las hormigas, termitas y escarabajos colectados, deberán preservarse en alcohol al 80%; en el caso de las termitas, se incluirán soldados, al igual que obreras. Las lombrices de tierra y moluscos, generalmente, se conservan en formol (formaldeído) al 4% para evitar la supuración de la mucosa. Se deberá utilizar un tubo o frasco por cada espécimen o población encontrada (o colonia aparente). Se añadirá una etiqueta dentro del alcohol o formaldeído, en la que se anotan los datos siguientes (con lápiz o tinta indeleble; no usar bolígrafo o pluma):

- Fecha y clave de identificación del lugar.
- En el caso de transectos o monolitos alineados, el número de la sección en el transecto en donde se encontró el espécimen (1,2,3 ó 4).
- El microhábitat en cuestión (madera nueva, madera seca, madera podrida, montículo, suelo, hojarasca, suelo de raíz de árbol, etc.).

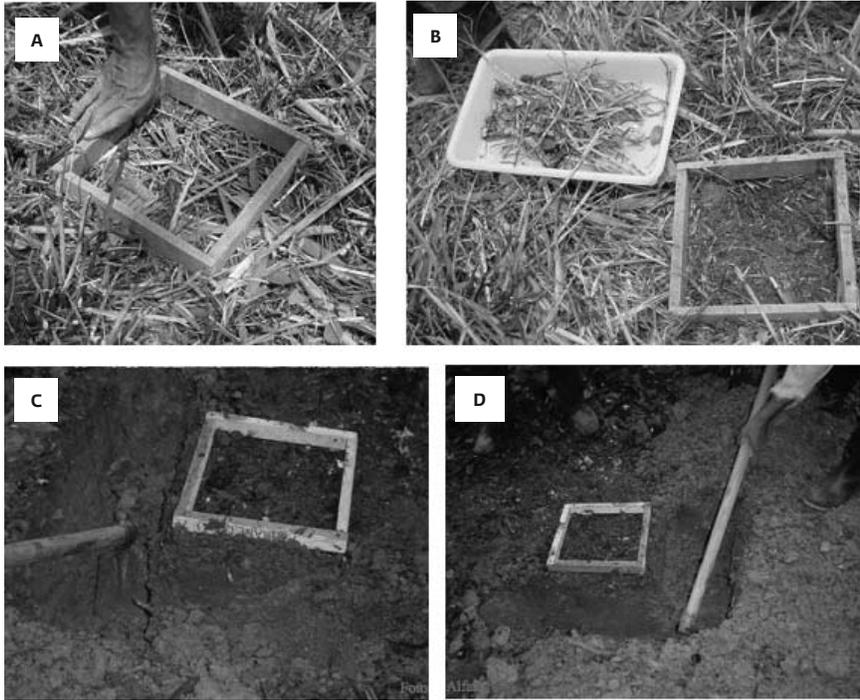
La información es importante para establecer la naturaleza de los organismos encontrados (especialmente la diversidad de grupos funcionales) y para construir una curva de acumulación de especies. Para evitar confusión en lugares ricos, las etiquetas deberán escribirse en el momento en que los especímenes sean introducidos en los tubos o frascos. En otros casos, las etiquetas se pueden hacer cuando se ha completado la extracción en cada sección del transecto; sin embargo, cuando se hace la extracción durante un tiempo determinado, como en el caso de un transecto, el periodo destinado deberá incluir el tiempo para el llenado de la etiqueta.

Protocolo de muestreo alternativo para evaluar la abundancia y diversidad de lombrices de tierra en ecosistemas tropicales

Introducción

Este protocolo alternativo combina el llamado monolito de suelo TSBF (25 x 25 x 30 cm) y tres grandes monolitos (50 x 50 x 20 cm) para evaluar la abundancia y diversidad de lombrices de tierra a nivel local y de paisaje en ecosistemas tropicales;

Figura 3.1 Delimitación y excavación de un monolito pequeño (25 x 25 x 30 cm).



Nota: las ilustraciones A y B muestran la colocación de un marco de madera para delimitar el monolito y la limpieza de hojarasca suelta. La ilustración C muestra un monolito grande (50 x 50 x 30 cm) y la D un monolito pequeño (25 x 25 x 30 cm) y la excavación de la zanja, antes de muestrear el monolito.

satisface el requerimiento de rapidez y la necesidad de tomar en cuenta la heterogeneidad del suelo a nivel parcela.

Por más de una década, la mayoría de los estudios sobre lombrices de tierra han sido elaborados utilizando el método TSBF (Anderson e Ingram, 1993) para macroinvertebrados; véase Gilot *et al.* (1995); Haymes *et al.* (2003); Dlamini y Haynes (2004) para el muestreo de lombrices de tierra en África; véase Bhadauria *et al.* (2000) para Asia y Decaëns *et al.* (1994, 2004), Barrios *et al.* (2002) y Mathieu *et al.* (2004), para ejemplos de América del Sur. En todos los casos, siendo la unidad de muestreo, un monolito cuadrado de suelo de 25x25 cm y de 30 cm de profundidad, los monolitos se distribuyen a lo largo de un transecto corto (40 m) con, por lo menos, cinco monolitos por parcela bajo estudio.

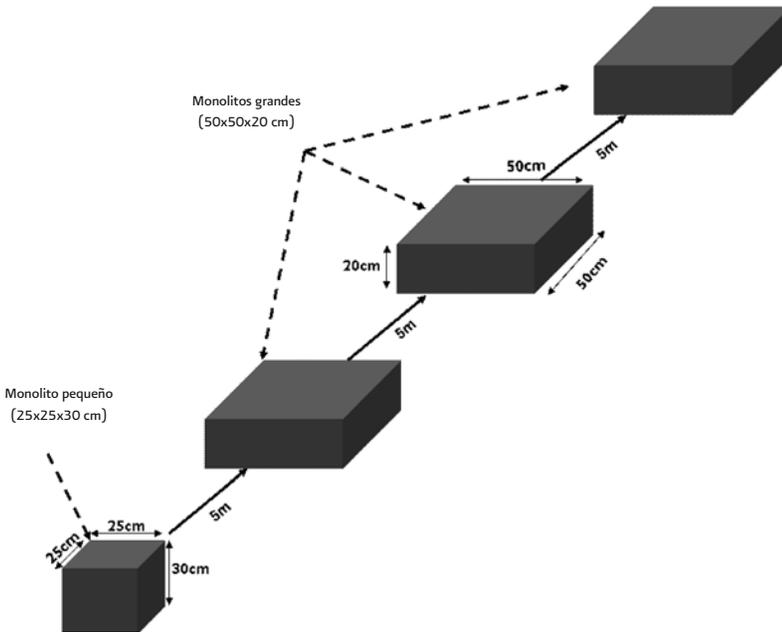
A pesar del éxito relativo del método TSBF para estimar la abundancia y diversidad de los macroinvertebrados del suelo, Eggleton *et al.* (1999) y Agosti *et al.* (2000), han propuesto protocolos de muestreo más exhaustivos para muestrear termitas y hormigas, respectivamente, debido a su especificidad de grupo funcional, la carencia relativa de centros de colonias y su distribución altamente parchada. Se pueden usar argumentos similares para justificar un muestreo más extensivo de lombrices de tierra, aunque pequeños monolitos han sido utilizados con éxito para identificar cambios importantes en la diversidad de lombrices de tierra a nivel parcela, bajo diferentes prácticas de manejo de suelo (Fragoso *et al.*, 1997; Decaëns y Jiménez, 2002), aunque pocas investigaciones se han enfocado a la evaluación de la abundancia y diversidad de lombrices de tierra en paisajes agrícolas.

Originalmente, se estudió la demografía de lombrices de tierra, utilizando grandes monolitos de suelo de 1 m² x 40 cm de profundidad; por ejemplo, Vincent, 1969; Lavelle, 1978), pero consumen mucho tiempo y resultan tediosos. Recientemente, una combinación más eficiente de 100 x 100 x 40 cm para grandes y de 25 x 25 x 30 cm para monolitos pequeños de suelo, ha sido reportada para monitorear la dinámica de población de la lombriz peregrina *Hyperiodrilus africanus* (Tondoh y Lavelle, 2005). Los monolitos de tamaño medio (50 x 50 x 40 cm) fueron utilizados por Ortiz-Ceballos y Fragoso (2004) para evaluar el impacto de una cobertera en poblaciones de lombrices de tierra. Como las prácticas agrícolas contemporáneas muestran un mosaico de tipos de uso de suelo, cubriendo grandes áreas, el reto será desarrollar un protocolo de muestreo rápido para muestrear a nivel paisaje. Tal avance será crucial para desarrollar indicadores de degradación de suelo (Moreno y Halfpeter, 2001; Burel *et al.*, 1998) porque las lombrices de tierra son reconocidas por presentar sensibilidad ante la perturbación antropogénica (Fragoso *et al.*, 1997; Fragoso *et al.* 1999; Decaëns y Jiménez, 2002).

Protocolo de muestreo

De manera ideal, el muestreo debería realizarse al final de la temporada de lluvias, cuando se sabe que las lombrices de tierra son más activas (Tondoh y Lavelle, 2005); en cada punto de muestreo se extrae un pequeño monolito de 25 x 25 x 30 cm que se rebana en tres capas: 0-10 cm, 10-20 cm y 20-30 cm. Las lombrices de tierra son colectadas a mano. Se seleccionan cinco puntos de muestreo al azar, en cada tipo de uso de suelo. Este esquema de muestreo estratificado, que combina pequeños y grandes monolitos, permite tomar en cuenta la variación a

Figura 3.2 Esquema de alineación de monolitos complementarios de lombrices de tierra.



nivel parcela de las poblaciones, mientras la variación a nivel paisaje se hace con un muestreo en los usos de suelo más representativos. En cada punto seleccionado, las lombrices de tierra son muestreadas, de acuerdo con el procedimiento de TSBF (Anderson e Ingram, 1993). De manera adicional, se extraen tres grandes monolitos de 50 x 50 cm y de 20cm de profundidad, en intervalos de 5 m, a lo largo de un transecto, con un punto de partida elegido al azar, perpendicular a la pendiente, cuando se considere apropiado (TSBF modificado, Anderson e Ingram, 1993). El transecto aparece representado esquemáticamente en la Figura 3.2. Monolitos adicionales son extraídos para poder tomar en cuenta la heterogeneidad a nivel de la parcela. Cada monolito mayor se separa en dos capas (0-10 y 10-20cm) y no en tres, como en los pequeños monolitos, porque la mayoría de los especímenes (57-99%) son localizados en los primeros 20cm durante la temporada de lluvias (Tondoh y Lavelle, 2005). Las lombrices de tierra se colectan a mano (Figura 3.3) y son almacenadas en una solución de formol al 4% para su posterior identificación. Los individuos después son identificados, contados y pesados.

Figura 3.3 Separación a mano de lombrices de tierra en charolas de plástico.



Identificación de lombrices de tierra y estimaciones de su abundancia

Especímenes de lombrices de tierra, previamente agrupados como morfoespecies, pueden ser identificados a nivel de familia, utilizando las claves desarrolladas por Blakemore (2005). Las especies de lombrices de tierra peregrinas comunes, que se encuentran distribuidas en toda la región tropical, son identificables a nivel especie utilizando las guías y descripciones dadas por Blakemore (2002); sin embargo, las especies nativas requieren de la pericia específica del país, debido a la carencia de guías comprensivas para su identificación.

Para las especies africanas de Eudrilidae y Acanthodrilidae (Benhamiinae) se pueden utilizar las revisiones de Sims (1980, 1987) y Csuzdi (1996) y, cuando sea necesario, se debe consultar la descripción original de especies. Para la identificación de lombrices de tierra de la India y del Sureste de Asia, las monografías de Gates (1972), Sims e Easton (1972), Easton (1979) y Julka (1988) son las apropiadas. Desgraciadamente, no existen a la fecha monografías disponibles para la identificación de lombrices de tierra de América Central y América del Sur, por lo tanto, la revisión de Eisen (1900) y estudios seleccionados de varios autores (Righi, 1971, 1995; Frago y Rojas-Fernández, 1994; Zicsi, 2001, 2005) son los principales puntos de referencia. La abundancia de lombrices de tierra se estima

como el número de individuos por m² y la biomasa como g de individuos por m². La diversidad de lombrices de tierra se estudia en dos niveles complementarios: diversidad taxonómica y funcional (Bouché, 1977; Lavelle 1983; Fragoso *et al.*, 1977). El aspecto funcional de la diversidad resulta de gran interés para evaluar la relación entre diversidad y servicios del ecosistema.

El primer nivel de diversidad taxonómica trata del número y de la identidad de especies de lombrices de tierra. Se pueden utilizar tres categorías de expresión de la riqueza de especies: 1) el número de especies registrado en todos los monolitos, en cada tipo de uso de suelo, 2) la diversidad promedio expresada en términos de la media de número de especies por cada tipo de uso de suelo y 3) el índice Shannon-Wiener de diversidad (Pielou, 1996). El segundo nivel de diversidad taxonómica trata de la biogeografía de lombrices de tierra (Fragoso *et al.*, 1997). Dentro de un ecosistema dado, dos grupos de lombrices de tierra pueden ser distinguidos de acuerdo con su origen: especies nativas o exóticas. Especies nativas son las caracterizadas por una distribución restringida a nivel local, regional y continental, mientras que las especies exóticas son, en casi todos los casos, introducidas por interferencia humana; éstas han sido llamadas peregrinas para indicar su amplia distribución a niveles regionales y continentales (Lee, 1987). La relación nativas vs exóticas puede utilizarse como un índice para calcular la extinción de especies nativas o como un claro indicador de la invasión de especies exóticas o peregrinas. El análisis de comunidades de lombrices de tierra, con este enfoque, se lleva a cabo mediante la identificación en cada tipo de uso de suelo de especies nativas y exóticas o peregrinas. La estructura de las comunidades de lombrices de tierra puede ser caracterizada por la densidad y biomasa de lombrices nativas y exóticas

La importancia de la diversidad funcional en las lombrices de tierra ha sido ampliamente documentada (Lavelle, 1983; Blanchart *et al.*, 1997; Fragoso *et al.*, 1997 y Lavelle *et al.*, 1997). Los servicios que proveen las lombrices de tierra al ecosistema se relacionan con el impacto de su actividad en el sistema de suelo (Lavelle *et al.*, 1997). Desde el punto de vista ecológico, las comunidades de lombrices de tierra pueden dividirse en tres grupos (Bouché, 1977; Lavelle, 1981):

1. Lombrices epigeas: de tamaño pequeño, con pigmentación y que viven en la hojarasca, a nivel de la superficie del suelo.
2. Lombrices endógeas: de tamaño medio, no pigmentadas y que viven dentro del suelo. Como resultado de su actividad, producen excretas dentro del perfil del suelo y sobre la superficie.

3. Lombrices anecicas: de tamaño grande, sin pigmentación y viven en el suelo, pero comen en la superficie. Sus actividades forman una red densa de túneles dentro del suelo.

La mayoría de las lombrices de tierra que pertenecen a los tipos endógeos y anecicos son destacados ingenieros del ecosistema (Lavelle *et al.*, 1997) porque son activas mezclando y cavando el suelo, modificando así las propiedades hídricas y químicas del mismo. A las lombrices de tierra se les puede asignar una categoría ecológica o grupo funcional y posteriormente comparar dichos grupos con base en su densidad y biomasa.

MÉTODOS DE TRANSECTO PARA TERMITAS, HORMIGAS, ESCARABAJOS Y LOMBRICES DE TIERRA

Introducción

Este método utiliza un transecto de 100, 50 o 20 x 2m, fue desarrollado para bosques o localizaciones recientemente derivadas como en la agricultura de roza, tumba y quema, y sigue las descripciones formales de Jones e Eggleton (2000), Swift y Bignell (2001). Los datos obtenidos son cualitativos (identificación y número de especies) y/o semi-cuantitativos (abundancia relativa de especies y/o grupos funcionales específicos), aunque se considera que, relativamente, presentan una alta resolución, por lo que los transectos se tratan separados de los monolitos y de las trampas *pitfall*. Este método se considera de bajo impacto y resulta idóneo para ser usado por aquellos que no son especialistas en termitas y puede ser completado en cada punto de muestreo por dos personas en un día (dos días para un transecto de 100 m). El método, tal y como se describe y desarrolla más adelante, se basa en un transecto de 100 m, aunque se ha acortado a 20 m en el protocolo estándar, para el proyecto CSM-BGBD y a 50 m en el esquema alternativo de muestreo (véase Capítulo 2).

Equipo requerido

Brújula, cinta métrica de 30 m o preferiblemente cuerda de *nylon* o mecate, marcada en secciones de 5 m, utilizando cinta naranja o amarilla fluorescente o a prueba de agua y un palo de 2 m. Cada persona lleva un machete o *parang* afilado, una

cuchara de albañil, una charola de plástico o metal con reborde alto, dos pares de pinzas, alrededor de 40 frasquitos de aproximadamente 1 x 5 cm, con alcohol al 80% (se necesitarán más para hábitats ricos en termitas); un cuchillo de campo de hoja fija, de alrededor de 8-10 cm, puede ser útil para picar madera o suelo.

Procedimiento

Se traza una línea de transecto de 20, 50 o 100 m junto al monolito, a una distancia suficiente para evitar cualquier perturbación durante el muestreo. Se coloca el transecto de manera que visualmente atraviese los alrededores de manera homogénea, evitando grandes arroyos, acantilados o caminos en uso que no sean hábitats adecuados para termitas; sin embargo, el transecto puede incorporar otros fenómenos naturales del ambiente biótico que contribuyen a su heterogeneidad física, tales como pendientes, estrechas zanjas con arroyos o cortes en el dosel. Frecuentemente se necesita evaluar, de modo subjetivo, cuando se trata de decidir sobre la línea ideal, especialmente en los casos de pequeñas parcelas. Las líneas de transecto no necesariamente tienen que ser rectas; pueden inclinarse para alcanzar ángulos de hasta 90°, para evitar obstáculos naturales, siempre que no se crucen con ellas mismas. En una parcela pequeña, un transecto puede curvarse sucesivamente por dos ángulos de 90° para que corra hacia atrás hasta su punto de partida, pero los dos "brazos" principales de la línea del transecto deberán encontrarse, por lo menos, a 15m de distancia. Alternativamente, se pueden colocar dos transectos de 50m (o de 10 m) para que queden en paralelo. Si la línea atraviesa un árbol, de área basal muy grande, el transecto se puede desviar hacia un lado, siempre que por lo menos una parte del sistema de raíces quede dentro de la cinta de muestra de dos metros de ancho. Es necesario anotar el punto de partida, dirección del transecto con la brújula y cualquier cambio de dirección. Si se emplean otros transectos en la misma parcela (por ejemplo, para poder replicar un monolito) los transectos deberán posicionarse para evitar interferencia mutua y separarse, para evitar pisadas excesivas en un solo lugar. Se debe asegurar que las líneas de *pitfall* se mantengan sin perturbación en todo momento.

El tiempo requerido para realizar transectos de 20 m es de 30 minutos de muestreo por dos personas, en cada sección de 5m. Un equipo de dos personas será capaz de muestrear entre 8 y 12 secciones por día (2 a 3 transectos). No obstante, ese tiempo podrá reducirse si se trabaja con varios equipos de dos personas, de manera simultánea, en diferentes secciones. El muestreo se estratifica por

nichos. Los siguientes micronichos son investigados con detalle: hojarasca y la superficie del suelo hasta una profundidad de alrededor de 5 cm; acumulaciones profundas de hojarasca y suelo entre grandes raíces que funcionan como retenedores; madera en todas sus etapas de descomposición; nidos de termitas o pistas de tierra en troncos de árboles y otra vegetación, nidos subterráneos epígeos y arbóreos y montículos de una altura de hasta 2 m sobre la superficie del suelo (incluyendo nidos de bolsitas suspendidos en la vegetación). El suelo, la hojarasca y los restos de madera pueden diseccionarse rápidamente en charolas; esto ayuda mucho a ver las termitas (Figura 3.4), escarabajos y lombrices de tierra en nichos crípticos o cuando escasea la luz. Los palitos deberán romperse en pedazos y golpearse moderadamente en las charolas para desplazar cualquier termita u hormiga que contengan. Los pedazos más grandes de madera deberán cortarse tomando en cuenta que pueden estar infectados en alguna parte. La madera podrida, incorporada en el suelo de superficie, o cubierta de pedazos de suelo, frecuentemente contiene termitas. Otras especies pueden habitar montículos y nidos o podrán coexistir con los que están construyéndolos, por lo tanto, es aconsejable comprobar la periferia y la base de la estructura, junto con sus cámaras centrales. El tronco de un árbol vivo puede ser investigado para ver si contiene túneles de termitas a una altura accesible, sin necesidad de usar una escalera o tener que trepar (alrededor de 2 m), sin olvidarse de las ramificaciones o de los helechos que pueden acumular suelo que contenga termitas, lombrices de tierra y, posiblemente, otros invertebrados.

Normalmente se requiere de un corto periodo de entrenamiento u orientación para que colectores sin experiencia puedan muestrear con la misma eficiencia que un experto. Idealmente, un transecto de entrenamiento, de 50 ó 100 m, debería muestrearse la primera vez bajo la supervisión de un colector experimentado. Los colectores deberán trabajar de manera constante (no frenética) en cada uno de los periodos de muestra de 30 minutos y tratar de mantener el mismo nivel de eficiencia de muestreo en cada sección del transecto; por esta razón y para poder minimizar la necesidad de tener que trabajar con escasa luz, se recomienda completar no más de 12 secciones en un día. También resulta de ayuda descansar unos minutos entre secciones. En la mayoría de las localizaciones no es necesario coleccionar cada termita y las especies más comunes podrán ser ignoradas después de muestrearse inicialmente para poder buscar las formas más raras o crípticas o para buscar soldados en especies que tengan una relación relativamente baja de soldado/obrero (tomando en cuenta que algunas especies no tienen soldados). Es imposible muestrear con lluvia fuerte, por ello se permite interrumpir la labor

Figura 3.4 Extracción de termitas de una muestra de suelo en una charola de aluminio.



Nota: las pinzas finas son idóneas para atrapar insectos con cuidado, sin dañarlos. Alternativamente, se puede usar un pincel de artista humedecido con alcohol para depositar el espécimen en el frasco colector.

hasta que mejoren las condiciones climatológicas. El trabajo puede dividirse entre los colectores, previo acuerdo; por ejemplo, cada persona trabaja en una cinta de un metro de ancho, en lados opuestos de la línea, para dividir cada sección en dos subsecciones de 2.5 x 2 m, de manera que mientras uno muestrea la madera, el otro examina el suelo y las raíces de los árboles. Esto dependerá de la naturaleza del lugar y de la topografía, sección a sección. Se recomienda que el suelo se extraiga en, por lo menos, una docena de lugares separados en cada sección del transecto. En los transectos donde se encuentran pocas termitas, es importante observar el protocolo de muestreo con precisión, a pesar de que se trate de una pequeña cosecha, sin interrumpir el trabajo.

Procesamiento de especímenes

Los especímenes representativos de las termitas encontradas deberán ser preservadas en alcohol al 80% y, en lo posible, contener soldados y obreros. Se debe destinar un tubo de especímenes para cada población (o colonia aparente), en el

cual se introducirá una etiqueta, donde se anotan, con lápiz o tinta indeleble y no, con pluma o bolígrafo, los siguientes datos:

- Fecha y clave del transecto.
- Número de sección en el transecto donde se encontró el espécimen (1, 2, 3, etc.).
- El micro hábitat en cuestión (madera fresca, madera seca, madera podrida, montículo, suelo, hojarasca, suelo a raíz de árbol).

Alternativamente, se podrán imprimir etiquetas numeradas, utilizando una impresora láser, que se cortarán y pegarán en una libreta de campo, en orden secuencial; en el campo únicamente se añaden las etiquetas a los frasquitos y se toma nota en la libreta de campo de los números por sección y del transecto, lo que facilitará el trabajo; todas las etiquetas seguirán el mismo patrón, por lo que se podrán leer con mayor facilidad, reduciendo así las posibilidades de cometer errores en la numeración. Todas las notas de campo se guardan en la libreta y, por lo tanto, los números de las etiquetas estarán relacionados. La información referente al micronicho en donde se encuentra cada espécimen es importante para poder establecer la naturaleza de la comunidad de termitas (especialmente la diversidad funcional del grupo) y para construir una curva de acumulación de especies. Para evitar la confusión, en lugares ricos en termitas, se deberán escribir las etiquetas (o las notas de campo) tan pronto como se hayan colocado las termitas en los tubos de especímenes. En otros lados, se podrán escribir etiquetas o notas, al completar cada sección del transecto; sin embargo, los treinta minutos para el trabajo deberán incluir el etiquetado.

Los especímenes pueden resultar dañados o afectados en su color por el suelo o basura contenido en el frasquito, razón por la cual deben limpiarse lo antes posible (se separan las termitas del suelo o de la hojarasca; se añade alcohol fresco y se escriben las etiquetas nuevas), el mismo día en que son colectados o tan pronto como sea posible. Lo anterior hace que el procesamiento sea más eficiente, para los taxónomos expertos, razón para destinar un mínimo de dos días a cada transecto de 100 m (proporcional para transectos más cortos). Las termitas deberán separarse en unidades taxonómicas reconocidas, por morfoespecies o especies nombradas. Al tratar cada sección de 5 m, como una muestra independiente, se podrá construir una curva de acumulación por especies basada en especímenes o simplemente por especies. Se generan diez secuencias al azar de las secciones por

medio de un trazo (en cada secuencia) de 20 secciones al azar, sin reemplazo. El número de especies encontradas en cada sección se usa para calcular el número acumulativo de especies, para cada selección de las diez secuencias; finalmente, se calcula la media acumulativa de especies de los diez juegos de 20 secciones para cada sección y se construye una curva de acumulación de especies. Una curva ideal debería ser asintótica, es decir, debería subir y posteriormente inclinarse, indicando que se encontrarían pocas o nuevas especies con transectos adicionales en el área. La riqueza específica del lugar puede ser estimada utilizando métodos de extrapolación, tales como Jackknife de primer orden y Jackknife de segundo orden, Chao y ACE, entre otros (Magurran, 2004) que son implementados por el *software* libre EstimateS (Colwell, 2000, 2004). Las especies y morfoespecies encontradas por transecto pueden ser desde sólo unas cuantas hasta más de 50, dependiendo del lugar y de la región biogeográfica.

Identificación

El primer paso para compilar una lista de especies y organizar los datos del ensamble de las especies encontradas, será identificar cuáles son las que están presentes en la muestra; la identificación consiste en la determinación de la posición de un espécimen en la clasificación existente, trabajando desde niveles altos como órdenes hasta familia, género y especie. Lo ideal sería que todos los especímenes fueran identificados hasta especie, pero esto muchas veces no es posible para algunos grupos de organismos de suelo. Una manera más realista sería obtener la lista final, parcialmente compuesta por especies identificadas y, el resto, se identificaría a nivel género y, se separaran en morfoespecies. Cuando se comparan datos de diferentes hábitats o localidades, es importante utilizar el mismo esfuerzo de identificación y métodos. También es importante que las morfoespecies "A", en el lugar 1, sean las mismas que "A", en el lugar 2. Una taxonomía pobre podría resultar en una baja o sobreestimación de diversidad y similitud de especies y hacernos llegar a establecer conclusiones erróneas. La identificación de organismos de suelo, a nivel especie, normalmente requiere una pericia taxonómica alta, lo que resulta muy laborioso en términos de tiempo. Las muestras y los especímenes necesitan ser etiquetados y organizados cuidadosamente. La colección entera deberá ser preservada durante un tiempo después de la identificación para su posterior confirmación y se debe de depositar, de manera permanente, un subjuego en una colección de una institución nacional, o bien, en un museo.

Los métodos comunes de identificación de la fauna del suelo incluyen: a) uso de claves de identificación publicadas, b) comparaciones con descripciones, c) comparaciones con colecciones de referencia y d) envío de especímenes a un experto taxónomo. Se utilizan, a modo de rutina, técnicas moleculares para la identificación de microorganismos, excluyendo animales. El formato de los nombres deberá seguir el código respectivo de nomenclatura. En el caso de animales, será el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica, 1999); para plantas, el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (Greuter *et al.* 2000); y para bacterias, el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (Sneath, 1992). El dato de autor y año de publicación no forma parte de un nombre de especies y su uso es opcional, aunque frecuentemente se recomienda, de manera particular, para grupos de organismos diversos o poco conocidos. No obstante, los Códigos de Nomenclatura contemplan reglas muy estrictas de formato para nombrar autores, que deberán ser respetadas: los géneros y especies se imprimen en cursiva, pero no es obligatorio; nunca se deben utilizar nombres manuscritos no publicados. Consulta un catálogo taxonómico que te permita comprobar la validez y cómo se deletrean los nombres, si existen.

La Tabla 3.1 presenta un ejemplo de una lista de especies. Se trata de una lista organizada en orden alfabético, lo cual generalmente resulta más práctico que un "orden taxonómico" subjetivo. Se muestran tres niveles de identificación; por ejemplo, *N. corniger* y *N. similis*, fueron identificadas plenamente a nivel especie. *Termes* sp. A y *Termes* sp. B fueron identificadas únicamente a nivel género y morfoespecie. La abreviación "cf" en el caso de *Coatitermes* y *Armitermes*, (abreviación del latín *confer*, compare). Tal abreviación se usa para indicar que la identificación es incierta. Otras abreviaciones, ocasionalmente, se utilizan con la misma connotación o de manera similar. Nota que las abreviaciones "sp" y "cf" no aparecen en cursivas. El paréntesis que abarca el nombre de los autores indica que la especie fue originalmente descrita en otro género y después se transfirió al género actual. Los paréntesis, por lo tanto, tienen un significado y su uso se determina de acuerdo con las reglas de nomenclatura.

Lista de guías y catálogo de identificación

Se puede consultar una lista integrada de claves de identificación para termitas, hormigas y escarabajos en el apéndice 1 y listas más especializadas en las publicaciones

Tabla 3.1 Ejemplo de lista de especies.

No.	Especie	Selva	Barbecho	Cultivo	Agroforestal	Pastizales
1	Kalotermitidae			1		
2	<i>Angularitermes nasutissimus</i>			1		
3	<i>Angularitermes</i> sp.		1			
4	<i>Angularitermes</i> sp. 1	6	13			4
5	<i>Angularitermes</i> sp. 2	1	9	2	3	10
6	<i>Angularitermes</i> sp. 3	6	13	19	1	71
7	<i>Angularitermes</i> sp. 4	25	46	20	9	47
8	<i>Angularitermes</i> sp. 5	8	2			3
9	<i>Angularitermes</i> sp. 6	1				
10	<i>Angularitermes</i> sp. 7		2			
11	<i>Angularitermes</i> sp. 8	1	1			
12	<i>Angularitermes</i> sp. 9		15	10	1	
13	<i>Angularitermes</i> sp. 10					2
14	<i>Angularitermes</i> sp. 11	7	7			16
15	<i>Angularitermes</i> sp. 12		1			
16	<i>Angularitermes</i> sp. 13			1		
17	<i>Angularitermes</i> sp. 14	1				1
18	<i>Angularitermes</i> sp. 15		2	1		
19	<i>Angularitermes</i> sp. 16	1	6	7	4	
20	<i>Angularitermes</i> sp. 17	1		3		14
21	<i>Angularitermes</i> sp. 18	2				
22	<i>Angularitermes</i> sp. 19			4		
23	<i>Araujitermes nanus</i>		1			1
24	<i>Armitermes holmgreni</i>		3			
25	<i>Armitermes minutus</i>	1				
26	<i>Armitermes</i> cf. <i>peruanus</i>	3	1	1	5	
27	<i>Armitermes teevani</i>				1	
28	<i>Atlantitermes osborni</i>	1	2			
29	<i>Caetetermes taqarussu</i>	1	1			
30	<i>Constrictotermes cavifrons</i>	1				

Tabla 3.1 Continúa.

No.	Especie	Selva	Barbecho	Cultivo	Agroforestal	Pastizales
31	<i>Coptotermes testaceus</i>	5	10	8	3	2
32	<i>Cornicapritermes mucronatus</i>	1	1			
33	<i>Cornitermes pugnax</i>	10	22	7	4	
34	<i>Cornitermes</i> sp.	9	4			
35	<i>Curvitermes odontognathus</i>		1			1
36	<i>Cylindrotermes flangiatus</i>	10	1			
37	<i>Cylindrotermes parvignathus</i>	7	1			
38	<i>Embiratermes parvirostris</i>	1	3	1		
39	<i>Heterotermes tenuis</i>	18	85	56	29	6
40	<i>Labiotermes psilus</i>	2				
41	<i>Microcerotermes strunckii</i>	2	1			
42	<i>Nasutitermes callimorphus</i>	3	6	2	2	1
43	<i>Nasutitermes corniger</i>	15	29	11	16	1
44	<i>Nasutitermes gaigei</i>	1	1	1		
45	<i>Nasutitermes guayanae</i>	12	35	9	1	
46	<i>Nasutitermes octopilis</i>		6	1		
47	<i>Nasutitermes</i> sp. A	17	1	5		
48	<i>Nasutitermes</i> sp. I	21	89	29	37	19
49	<i>Nasutitermes</i> sp. J		4	1		
50	<i>Nasutitermes surinamensis</i>		2	1		1
51	<i>Nasutitermes unduliceps</i>	1				
52	<i>Nasutitermes wheeleri</i>		1			
53	<i>Neocapritermes pumilis</i>	2				
54	<i>Neocapritermes</i> sp.	6		1		
55	<i>Neocapritermes talpa</i>	1	1			

Tabla 3.1 Continúa.

No.	Especie	Selva	Barbecho	Cultivo	Agroforestal	Pastizales
56	<i>Neocapritermes taracua</i>		1	2		
57	<i>Neocapritermes villosus</i>	6		3		
58	<i>Obtusitermes</i> sp.	8				
59	<i>Planicapritermes planiceps</i>	1				
60	<i>Rhinotermes hispidus</i>	1	9	6		
61	<i>Rhinotermes marginalis</i>	1	3	5		
62	<i>Rotunditermes bragantinus</i>	2				
63	<i>Rugitermes</i> sp.	1				
64	<i>Ruptitermes</i> sp. 1	1				
65	<i>Ruptitermes</i> sp. 2	1				
66	<i>Ruptitermes</i> sp. 3		1			
67	<i>Subulitermes baileyi</i>			1		
68	<i>Subulitermes microsoma</i>		1			
69	<i>Syntermes molestus</i>	5	5	4		
70	<i>Syntermes spinosus</i>	1				
71	<i>Syntermes territus</i>	1	2			
72	<i>Termes hispaniolae</i>			2		
73	<i>Termes medioculatus</i>	1	1			3
74	<i>Triangularitermes</i> sp. 3		3			
75	<i>Triangularitermes triangulariceps</i>	9	8	2		
76	<i>Velocitermes</i> sp.	9	7	1	3	
	Muestras	259	471	229	119	203
	Especies	52	50	35	15	18
	Transectos	20	39	18	10	13
	Índice Shannon(H)	3.41	2.91	2.80	2.04	2.01
	Índice Simpson	0.96	.90	.90	.81	.80
	Rarefacción (100 muestras)	34.4	26.6	25.3	14.3	14.1
	Estimación de Chao	86.7	81.8	52.3	17.2	25.3
	Estimación de Jackknife 1	74.8	72.4	50.1	18.6	25.4

taxonómicas para termitas, en los apéndices 2 y 3. Si los detalles bibliográficos no están incluidos en la tabla, pueden consultarse en la lista de literatura, al final del presente capítulo. Invariablemente, la disponibilidad de claves adecuadas publicadas, junto con su calidad, varían entre el taxa y entre regiones, por lo que muchos museos o instituciones científicas dedicadas a la taxonomía y conservación de la biodiversidad, cuentan con sus propios manuales, los cuales no están disponibles para el público en general. Existe también una “literatura gris” extensiva de reportes de talleres, conferencias y documentos producidos por proyectos de desarrollo internacional sin una distribución global, que se centran en una sola región. El mejor enfoque para identificación, por ende, será el entrenamiento o bien que el procesamiento de especímenes esté a cargo de un taxónomo con experiencia, antes de tomar las muestras.

Interpretación de resultados

Los ensambles de especies son grupos de especies relacionadas taxonómicamente, de un hábitat o área geográfica específica. Algunas veces se refieren a “comunidades de especies”, pero este término no es correcto, pues dichos ensambles son delimitados por una clasificación taxonómica basada en historia y filogenia y no, en relaciones ecológicas actuales. Los ensambles pueden o no, formar un grupo funcional (GF) uniforme y su composición también puede verse afectada por los métodos de muestreo utilizados. La caracterización de un ensamble de especies involucra varios pasos, desde muestreo en campo hasta identificación y análisis de datos. Una de las principales propiedades de un ensamble es “la diversidad de especies”, la cual se puede definir y estimar por varios métodos. Casi siempre la muestra no contiene todas las especies presentes en el hábitat, por lo tanto, es necesario extrapolar de la muestra y utilizar estimaciones comparables de la diversidad local. Los ensambles de diferentes hábitats o localidades pueden compararse con varias estimaciones o índices y agruparse de acuerdo con sus similitudes. Aunque la información básica generada es la de riqueza específica, otra información puede ser obtenida del transecto. Lo más importante es la diversidad funcional del grupo, esto se obtiene como resultado de la anotación del número de especies y morfoespecies. Las termitas pueden colocarse dentro de las siguientes categorías tróficas:

- *Las que se alimentan del suelo.* Las termitas distribuidas en el perfil de suelo, la capa de hojarasca orgánica y/o montículos epigeos se alimentan del suelo mineral, aparentemente, con un grado de selección de limos y fracciones de ar-

cilla. Aunque el material digerido es altamente heterogéneo, quedan proporciones más altas de materia orgánica del suelo y sílica, y menos tejidos de plantas reconocibles que en otros grupos (Sleaford *et al.*, 1996).

- *Las que se alimentan del suelo y de madera.* Las termitas que se alimentan de madera muy podrida, la cual se ha vuelto fácilmente desmenuzable y que se asemejan al mismo suelo o que predominan dentro del suelo, debajo de troncos o en suelo adherido a la superficie de troncos en estado de putrefacción, o mezclada con hojas podridas en complejos de limo - raíces. Este grupo es sinónimo de “alimentadores medios” *sensu* DeSouza y Brown (1994), pero no en la misma categoría de “alimentadores de madera podrida”, reconocida por Collins (1989).
- *Las que se alimentan de madera.* Las termitas que se alimentan de madera y que cavan túneles en piezas más grandes de madera, que pueden volverse centros de colonias. Este grupo incluye termitas con nidos arbóreos, subterráneos o epígeos, pero que se alimentan en otro lado y muchas Macrotermitinae que cultivan jardines de hongos. El término “madera” incluye ramas muertas, todavía unidas del árbol viviente y árboles muertos en pie, al igual que otros que se han caído y se conservan aún frescos, o bien, todos menos los que se encuentran en una fase de descomposición terminal.
- *Las que forrajean la hojarasca (Termitas forrajeras).* Las termitas que buscan hojas muertas, pastos vivos o secos y pequeños pedazos de madera, normalmente cortan el material antes de consumirlo o lo llevan a sus nidos. Este grupo incluye algunos Macrotermitinae subterráneos y constructoras de montículos y otras Nasutitermitinae y algunas otras que se alimentan en la superficie del suelo, junto con por lo menos una termita inferior del sur de África *Hodotermes mossambicus* con un hábito similar. Este tipo de termita forrajera usualmente es más conspicua que otros tipos alimenticios, por razones de las numerosas galerías o placas de suelo que construye encima de la madera, hojarasca y superficie del suelo y porque hace agujeros que se abren en la superficie, provenientes de pasajes subterráneos o la formación de columnas descubiertas de individuos, normalmente compuestas por obreros y soldados forrajeros.
- *Las termitas de alimentación especializada o incidental.* Esta categoría sigue la lista de alimentación de termitas de acuerdo con Wood (1978); incluye especies que se alimentan de hongos, algas, briofitas y líquenes en la corteza de los árboles (por ejemplo, *Hospitalitermes hospitalis* en el sureste de Asia; *Ruptitermes* y otras especies de *Constrictotermes* en América del sur que se

alimentan de líquenes), las que se alimentan de excrementos o las carroñeras de cuerpos de vertebrados (probablemente consumidos oportunamente, aunque el excremento se puede considerar como forma de basura descompuesta) y también ciertas habitantes secundarias de montículos de termitas que se alimentan de los forros hechos de rica materia orgánica, encontrada en las cámaras interiores como inquilinas obligadas (Por ejemplo: *Ahamitermis* y *Incolitermis*, en Australia, Gay y Calaby, 1970; *Ophiotermes* y *Tuberculitermes*, en África oeste y central, Eggleton y Bignell, 1997; *Inquilinitermes*, que habitan dentro de los nidos de *Constrictotermes*). Algunas termitas también se alimentan de tejido de planta viva, aunque ninguna especie es realmente fitófaga.

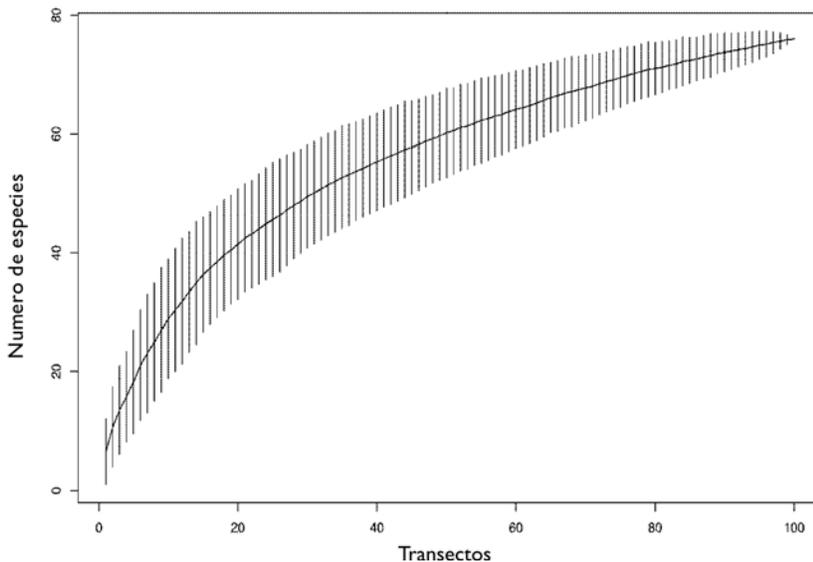
Las categorías no son mutuamente excluyentes y muchas especies toman sus alimentos de por lo menos dos fuentes diferentes, especialmente bajo condiciones desfavorables. La identificación del grupo funcional puede hacerse de acuerdo con el color abdominal en especímenes vivos (las alimentadas de suelo y suelo-madera son más oscuras), el lugar de su descubrimiento (en madera, suelo, etc.), otros aspectos biológicos como el lugar donde anidan (las que anidan en árboles normalmente no se alimentan de suelo), la ausencia de soldados (generalmente indica las que se alimentan del suelo) y la afiliación taxonómica (por ejemplo, las Macrotermitinae no se alimentan del suelo; la mayoría de la Apicotermitinae se alimentan de suelo o de suelo y madera). Si se dificulta la selección de un grupo funcional, una aproximación útil se obtiene dividiendo las especies en "alimentadas de suelo" o geófagas (alimentadas de suelo, y suelo y madera) como las definidas arriba, y "las que no se alimentan de suelo" (todas las demás). La forma de distribución de dichas categorías indica la estructura de la comunidad de termitas; las comunidades de selva son frecuentemente dominadas por las que se alimentan de suelo, pero la perturbación o un periodo de secas, generalmente, incrementa las proporciones de otros grupos funcionales; de manera similar, es posible comparar ensambles de termitas en base a tipos de nidos, según las siguientes categorías:

- *Las que anidan en madera.* Las termitas cuyos centros de colonia normalmente se concentran en troncos muertos o árboles en pie. Algunas veces la madera muerta es gradualmente reemplazada por material acartonado o por panales de hongos.
- *Las que anidan de manera hipogea.* Termitas cuyos centros de colonia quedan bajo el suelo. Los centros son pocos definidos y amorfos (especialmente en

los Apicotermitenae que no tienen soldados), con estructura interna poco obvia, aunque algunas forman nidos subterráneos complejos (por ejemplo Marcotermitinae). Este grupo incluye especies que son habitantes secundarias facultativas de montículos epigeos.

- *Montículos epigeos*. Termitas cuyos centros de colonia se sitúan arriba del suelo, pero excluyen montículos arbóreos, que se forman por sí solos o que se asocian con los contrafuertes de los árboles. Estos montículos, normalmente están bien definidos y constituyen estructuras altamente complejas, hechas de acuerdo con especificaciones típicas de la especie, pero con una tendencia a volverse más irregulares con el paso del tiempo por razones de erosión, adiciones y ocupación por parte de habitantes secundarios.
- *Montículos arbóreos*. Nidos que se sujetan a árboles y que se localizan en diferentes alturas, usualmente construidos con material de apariencia acartonada (cartón). En la mayoría de los casos, estos nidos están conectados con el suelo mediante pistas cubiertas que pueden ayudar a distinguir algunos nidos de termitas arbóreas de los de hormigas.

Figura 3.5 Ejemplo de curva de acumulación de especies con una desviación estándar, utilizando permutaciones de datos al azar.



Curvas de acumulación de especies

Las curvas de acumulación de especies son gráficas que representan la relación entre el esfuerzo de muestreo y el descubrimiento de las especies en un hábitat o región. El esfuerzo de muestreo puede ser medido por espécimen, muestra, trampa, tiempo (o persona por tiempo), o área. En el caso de un esfuerzo de colecta grande, la curva es asintótica y tiende a inclinarse. La forma más simple de estas curvas es conocida como la curva del colector; es únicamente una gráfica del número de especies acumuladas, en relación con el número de unidades de muestreo, en la secuencia en que fueron anotadas en el campo. Las curvas más sofisticadas, con desviaciones estándar, se pueden obtener utilizando permutaciones (reiteraciones) de los datos al azar (Figura 3.5) u otros métodos que normalmente requieren de programas computacionales especializados.

Las curvas de acumulación de especies pueden ser obtenidas reiterativamente mediante remuestreo al azar de los monolitos de suelo o por secciones de transectos, hasta 500 veces, utilizando el *software* de *EstimateS* versión 6.0b1 (Colwell, 2000). Para más análisis estadísticos, se establece la comparación de la media del índice Shannon-Wiener, número de especies y, en el caso de lombrices de tierra, producción de excretas por cada tipo de uso de suelo, mediante la prueba Fisher, con un 5% de nivel de probabilidad. La prueba Kruskal-Wallis ANOVA puede utilizarse para probar si existe un efecto significativo de los tipos de uso de suelo en relación con la abundancia de lombrices de tierra. La relación entre abundancia de lombrices de tierra y el índice de uso de suelo se comprueba utilizando regresiones. Otro método será normalizar la densidad y la biomasa de las lombrices de tierra antes de llevar a cabo el análisis paramétrico de varianza (ANOVA). Los análisis de multivariados, tales como el de componentes principales (PCA), el de correspondencia (AC) y el de co-inercia pueden ser útiles para determinar factores que afectan la densidad y la diversidad de lombrices de tierra, en todos los paisajes agrícolas (Thioulouse *et al.*, 1997).

HORMIGAS, OTRA MACROFAUNA Y MESOFAUNA EN HOJARASCA, UTILIZANDO EL MÉTODO WINKLER

Introducción

Las hormigas pueden clasificarse en grupos funcionales o *gremios*. Aunque algunos autores consideran estos nombres como sinónimos, tienen diferentes sig-

nificados: los *gremios* son un grupo de especies que utiliza el mismo tipo de recurso para su supervivencia (Terborgh y Robinson, 1986), mientras que los grupos funcionales se refieren a especies que utilizan estrategias similares para explotar el recurso y pueden estar formados por más de un *gremio*. Aunque han sido varias las propuestas de esquemas de clasificación de grupos funcionales, se recomienda utilizar el de Andersen (1997), originalmente diseñado para hormigas Australianas, pues es la más usada en diferentes países.

- *Especies dominantes*: especies muy abundantes y agresivas que influyen sobre la distribución y el comportamiento de otras especies de hormigas. Ejemplo: *Iridomyrmex* spp.
- *Especies subordinadas asociadas*: incluyen, en su mayoría, las pertenecientes al género *Camponotus*, que pueden coexistir con la dominante *Iridomyrmex* spp., debido al tamaño relativamente grande de su cuerpo y a su comportamiento sumiso.
- *Especies especialistas en clima y suelo*: estas especies (*Melophorus* spp., *Meranoplus* spp., *Aphaenogaster* spp. y *Notoncus* spp.) muestran adaptaciones fisiológicas, morfológicas y de comportamiento que reducen su interacción con la dominante *Iridomyrmex* spp.
- *Especies crípticas*: especies de hormigas forrajeras que normalmente anidan bajo el suelo (en la capa de suelo y hojarasca), de modo que minimizan el contacto con otras hormigas que no ocupan este hábitat (*Brachyponera* spp., *Eurhopalothrix* spp.).
- *Especies oportunistas*: escasamente competitivas, hormigas no especialistas que frecuentemente viven en ambientes perturbados (*Rhytidoponera* spp., *Paratrechina* spp.).
- *Especies generalistas myrmecinas*: especies que pertenecen al género *Monomorium*, *Crematogaster* y *Pheidole*; son cosmopolitas, no especialistas y altamente competitivas.
- *Especies forrajeras solitarias de tamaño relativamente grande*: predatoras solitarias que manifiestan muy poca interacción con otras especies de hormigas (especies dentro de los géneros *Myrmecia*, *Bothroponera* y *Odontomachus*).

Los siguientes son ejemplos de gremios en la selva brasileña de la Costa Atlántica (Delabie *et al.*, 2000).

- *Especies omnívoras*: especies que se alimentan de varias fuentes, incluyendo los restos de animales muertos; ejemplo: *Megalomyrmex*, *Pheidole* y *Solenopsis*.
- *Especies predatoras especialistas*: especies que se alimentan de un solo tipo de presa; ejemplo: *Amblyopone* (predadoras de termitas) y *Thaumatomyrmex* (predadoras de miriápodos) y *Strumigenys* (predadoras de colémbolos).
- *Especies predatoras generalistas*: especies que se alimentan de diferentes tipos de presas; ejemplos: *Gnamptogenys* (hormigas y otros insectos depredadores), *Anochetus* e *Hypoponera*.
- *Especies de hormigas legionarias*: también conocidas como “formigas da correição”, son generalistas o especialistas dentro de las especies predatoras. ejemplos: *Eciton*, *Labidus* (predadoras generalistas) y *Neivamyrmex* y *Normamyrmex*, predatoras especialistas que comen otras hormigas.
- *Especies predatoras de suelo*: especies que se establecen en el suelo y en la hojarasca, donde son forrajeras; por ejemplo, *Pachycondyla* y *Centromyrmex* (inquilinas de nidos de termitas), probablemente comedoras de larvas de termitas del género *Syntermes* (Delabie, 1995).
- *Especies de hormigas subterráneas*: dependen de gotitas de aguamiel y comen secreciones de azúcar de otros insectos; ejemplo: *Acropyga*.
- *Especies de hormigas arbóreas dominantes*: especies omnívoras que anidan en árboles; forrajean toda la vegetación arriba de la superficie y en la hojarasca; son altamente agresivas y presentan una influencia competitiva sobre otras especies; ejemplo: *Azteca* y *Crematogaster*.
- *Especies de hormigas dominantes en suelo u hojarasca*: hormigas forrajeras de hojarasca y suelo o de la superficie; se subdividen en dos grupos: a) predatoras generalistas grandes, ejemplo: *Odontomachus* y *Ectatomma*; b) verdaderas omnívoras: *Brachyomyrmex*, *Campanotus*, *Paratrechina*, *Solenopsis* (especies grandes) y *Wasmannia*.
- *Especies cultivadoras de hongos*: especies que utilizan hongos simbióticos; normalmente miembros de Attini; ejemplos: *Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycocrepurus*, *Myrmicocrypta*, *Sericomyrmex* y *Trachomyrmex*. Utilizan hojas frescas, carroña y restos de plantas para cultivar sus hongos.

También existen otras clasificaciones funcionales; para trabajo de campo práctico, es conveniente escoger las clasificaciones más cortas, por ejemplo, la empleada en el taller CSM-BGBD (2005):

- Carnívoras (especialistas o generalistas), con un centro de colonia subterránea.
- Carnívoras (especialistas o generalistas), con el centro de su colonia en las capas superficiales de hojarasca.
- Carnívoras (especialistas o generalistas), con un centro de colonia epigeo o arbóreo.
- Herbívoras, con un centro de colonia subterráneo.
- Herbívoras, con un centro de colonia en las capas superficiales de hojarasca.
- Herbívoras, con el centro de colonia epigeo o arbóreo.

Procedimiento de muestreo

El procedimiento completo se lleva a cabo en tres fases: a) tamizar en campo para separar la hojarasca fina (con hormigas) de la materia más gruesa; b) transportar al laboratorio dentro de una bolsa segura; c) extraer las hormigas dentro de la trampa *Winkler*, cerrado pero ventilado. Se recoge primero la hojarasca, que se encuentra en, por lo menos, tres cuadrantes de 1 m², preferentemente colocados a lo largo de la línea de transecto, junto a la coordenada GPS y al monolito (Ilustración 1; véase también el Capítulo 2). Se utiliza un marco para delimitar un área de un 1 m² y se remueve la hojarasca a mano, trabajando desde el borde hacia el centro, con guantes de cuero. Se tamiza cada muestra de hojarasca para remover pedazos grandes, realizando movimientos laterales, hacia arriba, de manera que se puedan separar los fragmentos más gruesos. La fracción fina queda en el fondo de la bolsa del tamiz, junto con las hormigas y se transfiere a bolsas en campo. Esto debe hacerse con suficiente habilidad, de manera que no escape ningún insecto. Una vez en el laboratorio, el contenido de las bolsas de campo se transfiere a redes; posteriormente, estas redes se fijan dentro de la trampa *Winkler*, los cuales son colgados en un lugar cubierto, ventilado y bajo condiciones ambientales. Se coloca un frasco con alcohol al 70% en la base de la trampa *Winkler*; conforme se seque la hojarasca, lentamente las hormigas y otros insectos migran hacia afuera y se caen en el alcohol; se mantiene la trampa durante por lo menos 72 horas, con el fin de maximizar la recuperación de los especímenes (Delabie, 1999). Se almacenan los especímenes en tubos cerrados y etiquetados, en alcohol al 70%; como complemento o alternativa, cuando los *Winklers* no se encuentren disponibles, se puede pasar la hojarasca burda por una malla de 2 mm, sobre una sábana blanca. Este procedimiento permite separar la macrofauna pequeña y alguna de la mesofauna

del material orgánico y, de esta manera, se pueden recolectar los especímenes de la sábana, utilizando un aspirador manual (*pooter*); en este caso, se marca un límite de búsqueda de 30 minutos por cada metro cuadrado de hojarasca muestreada. La hojarasca seca, contenida en la trampa Winkler, deberá ser pesada al final de la extracción.

La lista completa de los materiales para la extracción con trampas Winkler (Bestelmeyer *et al.*, 2000) es la siguiente:

- Marco con una medida de 1 x 1 m de madera, plástico o aluminio para delimitar el área de muestreo.
- Tamiz de malla grande, de alrededor de 5 mm, que entre dentro de una bolsa resistente de *nylon* o tergal, de aproximadamente 1.5 m de largo.
- Bolsas de *nylon*, de aproximadamente 34 cm de ancho x 55 cm de largo, las cuales se usarán en campo para transportar el material tamizado, hasta el lugar donde se encuentren las trampas *Winkler*.
- Redes, una por cada trampa, de 25 cm de ancho y 37 cm de largo, las cuales serán llenadas holgadamente con la hojarasca transportada en las bolsas del campo y se colocaran en el centro de la trampa *Winkler* para dar paso a los invertebrados.
- La trampa *Winkler* consiste en una bolsa porosa de algodón o *nylon*, a prueba de insectos y mide 1.50 m de largo, 25 cm de ancho y 20 cm de profundidad central. Se achica el fondo de la bolsa para que se pueda colocar un frasco de aproximadamente 200 ml de capacidad, el cual contiene alcohol al 70%.

ESCARABAJOS, OTRA MACROFAUNA Y MESOFAUNA QUE SE ENCUENTRAN EN LA HOJARASCA: TRAMPAS *PITFALL* CON Y SIN CEBO

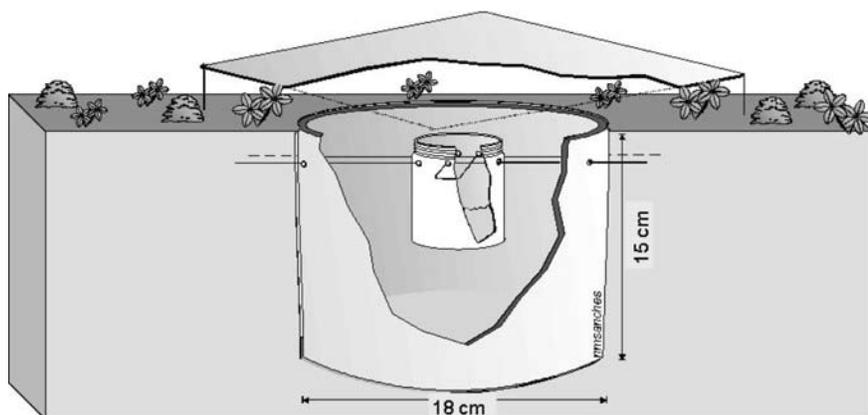
Introducción

Las trampas *pitfall* o de caída constituyen un método efectivo de recolección de muestras de los invertebrados meso y macro que viven en la hojarasca; dichas trampas están hechas de envases profundos relativamente pequeños; por ejemplo, vasos, tarros, botellas de plástico, latas, tazas, que se entierran de manera que la parte superior del envase quede exactamente al ras del suelo, después de limpiar la hojarasca suelta en el punto donde se va a colocar la trampa. Como variación de este método, la parte superior del envase puede situarse a 1 cm más arriba de

la superficie y se construye una rampa de suelo suelto a su alrededor. Las trampas se colocan bajo cubierta para evitar que entre la lluvia y funcionan como colectores de artrópodos que viven en el suelo y que caen en el envase, ahogándose en agua contenida en el fondo de la trampa. Las trampas normalmente se limpian y se recolocan una vez al día. Las *pitfall* son baratas, de fácil instalación, por lo que se utilizan frecuentemente en los trabajos de inventario de la biodiversidad; éstas ofrecen ventajas adicionales: se puede muestrear, de manera simultánea, la macrofauna y parte de la mesofauna (especialmente, colémbolos); se pueden utilizar específicamente para atrapar animales nocturnos. No obstante, presentan algunas desventajas: sobre todo que no muestrean todos los grupos taxonómicos con la misma eficiencia (escarabajos, hormigas, ortópteros juveniles, miriápodos, arañas y otros arácnidos grandes tienden a dominar, mientras que los insectos alados se escapan). Las trampas *pitfall* no son cuantitativas y dado que, normalmente, se encuentran dispuestas de manera lineal (para facilitar la instalación y el retiro) sufren la misma desventaja que los transectos, puesto que en ambas existe un alto grado de autocorrelación entre muestras adjuntas. Además, las *pitfall* son proclives a sufrir daños ocasionados por mamíferos y aves, al igual que a actos de vandalismo.

Una típica trampa *pitfall* puede observarse en la Figura 3.6; las dimensiones no son fundamentales, pero la trampa debe ser lo suficientemente amplia como para poder coleccionar un número razonable de especímenes y suficientemente profunda

Figura 3.6 Esquema de una trampa *pitfall* con cebo.



Nota: frascos con diámetro de 10 a 20 cm generalmente son efectivos. El diámetro más pequeño ofrece la ventaja de sufrir menos perturbación al momento de insertar la trampa.

para impedir la fuga. Entre 1 o 2 cm de agua en el fondo y un poquito de detergente serán suficientes para ahogar o inmovilizar a la mayoría de los animales y el detergente contrarrestará las propiedades hidrofóbicas de muchas cutículas de artrópodos. Un aditamento usual a las trampas es un techo inclinado para protegerlas de la lluvia, éstos pueden ser improvisados en el campo, sin embargo, una caja Petri de vidrio invertida, es lo ideal; ésta descansará sobre palitos o clavos. Los clavos galvanizados o de madera son la mejor opción para elevar el techo hasta dos

Figura 3.7 Trampa *pitfall* improvisada, hecha con un vaso, cuatro palitos pequeños y una cubierta de celofán.



o tres centímetros, de manera que permitan el acceso a las trampas. El vidrio pesa más que el plástico, por lo que el techo se mantendrá más estable, también crea un microhábitat como si fuera una cueva, lo que resulta atractivo para los artrópodos diurnos activos en la superficie, con una respuesta negativa a la luz, al mismo tiempo que ayuda a mantener el contenido fresco, retardando así la descomposición. Se puede argumentar que cuando se trata de sol directo, el techo debería ser opaco para evitar un efecto invernadero dentro de la trampa; éste deberá ser gris claro, de manera que no atraiga insectos voladores, ajenos a la fauna del suelo. El techo puede hacerse también de loseta de cerámica, plástico, madera u otro material lo suficientemente pesado como para que no lo eleve el viento o que pueda ser afectado por la lluvia o el sol y que además no sea comestible para las termitas. En algunas variaciones de este procedimiento se añade sal como conservador, pero se puede utilizar, de manera alternativa, una solución de hidrato de cloruro al 5% o una mezcla de ácido láctico/ácido acético (10% de cada uno de ellos, combinados con un poco de glicerina) para mejorar su conservación.

Las trampas *pitfall* pueden usarse en cualquier sustrato a nivel del suelo, con la excepción de agua y roca. Pueden emplearse para muestrear artrópodos en madrigueras, hojarasca, madera podrida y turba, aunque su aplicación más común es en un sustrato de suelo para la fauna de artrópodos activa en la superficie del suelo (Figura 3.7). El uso de envases de color fuerte o con dibujos puede mejorar la captura de parasitoides u otros insectos voladores que serán atraídos por los colores, pero deberán evitarse siempre que se pueda.

Colocación de trampas

Mientras las *pitfall* son estrictamente no cuantitativas, pueden ser útiles para la estimación de la diversidad alfa. En estudios referidos a riqueza de especies, el número de especies obtenidas por medio de las trampas *pitfall* se incrementa cuando éstas son colocadas en un máximo de unidades vegetales. Estudios que se enfocan a la abundancia, muestran que un nivel de captura aproximada puede obtenerse mediante la replicación de trampas *pitfall*, dentro de un rango de unidades vegetales. El número de réplicas puede basarse en curvas de acumulación de especies y ha de ser seleccionado para lograr un 85% o más de las especies buscadas. En otras palabras, ¿cuál sería el número apropiado de trampas *pitfall* requeridas para colectar el 85% o más de las especies capturables en una unidad vegetal dada? En el muestreo basado en transectos (Swift y Bignell, 2001), las *pitfall* normalmente se colocan en paralelo y

a cada lado, a una distancia de alrededor de 5 m. No se especifica el número; ello depende del largo del transecto. En el sistema de muestreo recomendado para el proyecto CSM-BGBD, capítulo 2, se sugiere que las *pitfall* sean colocadas a lo largo de la línea de transecto y a un lado de los cuadrantes de 1 m² del muestreo para hojarasca. El número recomendado es de 3 a 5 trampas por cada punto de muestreo, pero esto no trata de ser prescriptivo. Cuando una parcela es botánicamente compleja y varias unidades vegetales pueden ser reconocidas, las *pitfall* pueden ser distribuidas de la misma manera que en el muestreo casual para hormigas y termitas, es decir, cualquier microhábitat de interés podrá ser investigado. Un esquema variable de muestreo con *pitfall*, sugerido por Southwood (1978) hace uso de tablas de madera o de algunos obstáculos similares de hasta 30 cm de alto, colocados en la superficie del suelo, en forma de "V" o de embudo. De esta manera, se canalizan los animales móviles hacia la base de la "V" o embudo, donde se puede colocar una colección de *pitfall* de manera cercana (véase "cercas móviles").

La colecta de las *pitfall* es sensible a la perturbación, especialmente a pisadas; una precaución sensata sería, por lo tanto, ordenar el lugar entero. Se muestrea, según el orden de vulnerabilidad decreciente: primero las *pitfall* (de un día para otro) seguidas por los transectos, extracciones de núcleos de mesofauna y de microsimbiontes y, finalmente, el monolito. Un muestreo ocasional, fuera del área principal de actividad, podrá hacerse en cualquier momento.

Instalaciones de las trampas *pitfall*

Las trampas *pitfall* deben ser introducidas en el suelo con el borde superior del envase al ras del mismo o de la superficie de la hojarasca.

1. Se utiliza una cuchara de albañil para cortar y sacar las raíces y suelo, con el fin de hacer un hoyo del tamaño del vaso a introducir. Se debe tener especial cuidado para evitar remover suelo y raíces, de manera que se minimice al máximo la perturbación del microhábitat adjunto.
2. Se coloca la trampa *pitfall* en el hoyo y el borde externo se llena de tierra procedente de la excavación; se aplana con cuidado para mantener el mismo nivel que el borde de la trampa. Se usa el relleno para construir una rampa, de manera que los animales caminen sin obstáculos hacia el borde de la trampa.
3. El suelo fino, que cae en la trampa durante su colocación, puede soplar hacia afuera; las partículas más grandes, deberán ser extraídas a mano.

- 4 Se insertan tres soportes de techo en el suelo alrededor de la trampa, dejando así 2.5 cm de cada soporte visible, arriba del substrato.
- 5 Se llenan las trampas hasta alrededor de $\frac{3}{4}$ de su capacidad con agua y suficiente sal como para lograr una solución saturada (en caso de escoger una solución salina). Se añade un poquito de detergente como agente tensoactivo; siempre se necesitará sal u otro tipo de conservador en climas tropicales, a no ser que la frecuencia de mantenimiento sea de 24 horas o menos. El detergente facilitará la inmovilización por ahogamiento de animales activos.
- 6 Se coloca el techo sobre los soportes.
- 7 Se coloca un indicador con el número de lugar y trampa (en tinta indeleble o lápiz) cerca de la trampa; un palito, colocado verticalmente con un pedazo de cinta o banderín amarillo o naranja, situado en su parte superior, resulta útil para identificar la localización de la trampa y para prevenir pisadas accidentales.

El mantenimiento y el procesamiento de especímenes

El mantenimiento de las trampas se lleva a cabo de la siguiente forma: se quita el techo y se levanta el vaso interior que contiene el cebo (en el caso de que lo contenga, ver abajo). Se extraen los elementos grandes, tales como hojas, palitos, animales más grandes, etc. que hayan caído en la trampa; se agita suavemente el contenido restante del vaso para levantar los especímenes del fondo y se filtra con una red de acuario. Para poder retener los colémbolos, se utiliza por separado un colador de 53 μm .

Se transfieren los especímenes en bolsas de plástico o frascos desde la red, utilizando un frasco para enjuague o pipeta de agua, lo que servirá para separar los últimos ejemplares. Cada trampa se debe procesar de manera separada y se coloca en la bolsa o frasco una etiqueta con la identificación del lugar, trampa y fecha de recolección. Los especímenes deberán procesarse el mismo día en laboratorio o la base de campo, enjuagando el contenido de cada bolsa en la red, utilizando un flujo suave de agua, durante varios minutos, con el fin de remover la suciedad, la sal y el detergente. Se retira cualquier basura grande restante y se trata de retirar al máximo la tierra u otra basura orgánica.

El lavado de ejemplares en agua fresca es esencial porque el detergente y la suciedad forman una película sobre los insectos, si se les introduce directamente en alcohol; esta película es difícil o hasta imposible retirar una vez que los ejemplares quedan conservados, lo que dificulta que sean manipulables y visibles bajo

microscopio. Después de este lavado, se invierte el contenido de la red en una bolsa de especímenes y con un atomizador o piseta, lleno de alcohol, se lava suavemente el contenido de la red y los lados de la bolsa o frasco con el fin de que los ejemplares caigan hasta el fondo. Se cubre con alcohol la muestra hasta la altura de los ejemplares que se encuentran dentro de la muestra, y se introducen las etiquetas (escritas con tinta indeleble o con lápiz). Después de siete días se debe cambiar el alcohol y, si es posible, se refrigeran o se congelan las muestras, en espera de futuros procedimientos. Las muestras almacenadas deberán quedarse en una bolsa doble o frasco; se usa alcohol al 95% en el caso de colémbolos y al 70% para otros especímenes. Una variante de este proceso es usar dos filtros para colémbolos (malla 53 μm y 38 μm) se utilizan para separar estos animales de la otra fauna (ver Capítulo 4). Para el procesamiento de ejemplares de colémbolos véase Capítulo 4 (Mesofauna). Se pueden preparar trampas *pitfall* adicionales (opcional) con un contenido de 120 ml de etanol al 95% + glicerina (9:1) que se dejen en campo durante 72 horas. Se recomiendan dos trampas de este tipo más tres de diseño convencional por cada punto de muestreo.

Para mejorar la capacidad de captura con trampas *pitfall*

Es posible mejorar la capacidad de captura con las trampas *pitfall* haciendo varios cambios en el diseño de la trampa o usando cebo atractivo para artrópodos. La principal modificación en el diseño consiste en agrandar su diámetro, porque la capacidad de captura de las *pitfall* está en función del tamaño de su circunferencia. El hecho de usar cebos atractivos implica un mejoramiento general para la captura de una gran variedad de artrópodos. El cebo puede ser estiércol, carroña, frutos caídos u hongos en descomposición que resultan indistintamente atractivos para los detritívoros y algunos otros tipos de artrópodos, cebos de color (amarillo, rojo o azul) para atraer moscas o parasitoides, o sustancias sintéticas atractivas (por ejemplo, feromonas). El excremento humano fresco también es apetecible para una gran variedad de escarabajos y, por supuesto, se encuentra fácilmente disponible. El cebo deberá separarse del líquido conservador; esto se lleva a cabo con la suspensión del cebo en un pequeño bote colocado en la boca del envase principal. El uso de cebos resulta controversial porque el muestreo se sesga hacia los animales con un marcado olfato. Las trampas con cebo no podrán utilizarse en una evaluación semi-cuantitativa como medio de captura (por ejemplo, el porcentaje de todas las trampas estará ocupado por una sola especie) porque no se puede determinar

el área en donde se llevó a cabo el muestreo y la captura no sólo depende de la abundancia de animales, sino también de la movilidad relativa; sin embargo, esto es aplicable para las lista de especies de la localidad.

Lista de materiales requeridos

- Trampas *pitfall*: vasos de plástico de 1000 ml (con dimensiones de 180 mm de diámetro superior x 120 mm de profundidad).
- Techo de 200 x 200 mm (uno por trampa); loseta de color gris claro.
- Soportes del techo: clavos de madera o galvanizados de 152 mm (seis pulgadas).
- Agua: agua de la llave o de una fuente natural.
- Cubeta o envase para agua.
- Detergente puro: detergente líquido no perfumado para platos.
- Sal.
- Indicadores de plástico o de madera.
- Red de acuario o similar (de malla fina).
- Bolsas de plástico para muestreo con sello (tipo *ziplock* son las más convenientes para el almacenamiento de especímenes de campo) o frascos.
- Alcohol al 70 al 90%.
- Lápiz de grafito (ej. no. 2 o 6B)
- Etiquetas tipo tarjeta.

REGISTRO E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Parámetros

Registre el número y peso fresco de todos los organismos e identifique, por lo menos, hasta el nivel de determinación taxonómica y funcional más alta posible. La presencia y el peso de hongos cultivados por las termitas (si los hay) también deberán anotarse. Si no se cuenta con una balanza disponible en el campo, se puede estimar el peso fresco para ejemplares conservados, pesados después de un secado con papel absorbente; se hace una lista de especies, siempre que sea posible agruparlas en familias o subfamilias, utilizando el nombre genérico y por orden alfabético. Para completar la lista, se combinan los resultados de los monolitos, transectos, trampas *Winkler*, trampas *pitfall* junto con un muestreo casual.

Las especies plenamente identificadas deberán enlistarse con su nomenclatura binomial (género y especie) y la autoridad que las describió completas:

Ejemplo *Dorylus laevigatus* Smith.

Las morfoespecies deberán enlistarse por letra:

Ejemplo *Crematogaster* sp. A. y *Crematogaster* sp. B.

Es importante que la designación de letra sea consistente entre las localidades. Por ejemplo, la especie A es la misma especie en toda el área de muestreo. Las especies identificadas únicamente a nivel género, deberán enlistarse sin letras:

Ejemplo *Colobopsis* sp.

Incorpore la lista de especies en una tabla que muestre las localidades donde fue encontrada cada una.

Tabla 3.2 Densidad numérica (individuos m²) de termitas en siete localidades, a través de un gradiente de perturbación de la selva, en la provincia Jambi del centro de Sumatra.

Sitio	Media aritmética individuos m ⁻² (n=5)	Media geométrica individuos m ⁻² (n=5)*	95% de confianza
BS1, Selva primaria	2,892	971	347-12,827
BS3, Árboles talados	163	65	22-977
BS6, <i>Paraserianthes</i>	512	47	5-16,445
BS8, Hule	128	11	2-1,046
BS10, Selva de hule	211	25	2-9,772
BS12, Alang-alang	3	2	0-20
BS14, Cassava	26	10	2-534
Nivel del estrato (Promedio de todas las localidades)	Media aritmética individuos m ⁻² (n=5)	Media geométrica individuos m ⁻² (n=5)*	95% de confianza
	46	15	3-64
0-10 cm	106	80	43-148
10-20 cm	55	44	24-78
20-30 cm	49	4	1-50

* Datos retrotransformados.

Fuente: datos de especies de Jones *et al.*, 2003.

La abundancia se estima como número o individuos por m², de cada monolito y de cada estrato; se multiplica el número crudo de cada monolito x 16, con la excepción de las lombrices de tierra y milpiés, los cuales se muestrean en el mo-

nolito y la zanja (véase monolitos arriba); se determina la abundancia para cada taxón, también para cada grupo taxonómico superior y se combinan los datos de todas las especies; finalmente, se calculan las medias aritméticas. Para poder estimar el 95% de límite de confianza, los datos primarios deberán transformarse en $\log_{10}(x+1)$. Cuando no hay demasiados ceros (muestras sin organismos) este procedimiento debería normalizar los datos y producir varianzas homogéneas de grupo a grupo. En casos difíciles, se puede probar una transformación loglog. Se aplican estadísticas descriptivas al juego de datos transformados, incluyendo el 95% de los límites de confianza y con los datos transformados se obtiene una media geométrica. Se citan las medias para datos no transformados, junto con las medias geométricas, datos transformados y los límites de confianza para $\log_{10}(x+1)$. Los datos transformados pueden usarse para histogramas y comparaciones de lugar a lugar (Eggleton *et al.*, 1996); y prepare una tabla resumida, tal y como se muestra en la tabla 3.2).

Algunos indicadores de la abundancia relativa se pueden obtener a partir de la frecuencia de encuentro de diferentes especies (número de secciones de un transecto en donde se localizó la especie con respecto al número total muestreado, número de *pitfall* respecto al total, etc.). También partiendo de que un transecto completo representa una muestra única y grande, es posible asignar dominancia y, por lo tanto, derivar en índices de diversidad de especies y de equitatividad; también es posible que el número total de encuentros, o sea, el número de veces que se descubren colonias separadas en el caso de hormigas o termitas, o para otros grupos individuos separados a lo largo del transecto completo, puedan ser parámetros útiles de población. Este concepto no se puede aplicar de la misma manera para las *pitfall*. Para la información completa obtenida de transectos, véanse las discusiones en Eggleton y Bignell (1995), Eggleton *et al.* (1997), Jones e Eggleton (2000), Woodcock (2005) y Jones *et al.* (2005).

Se estima la biomasa en g.m^{-2} de manera similar a como se calcula la abundancia; se utiliza peso fresco o la masa de un espécimen parcialmente seco, si es posible. Se evita el uso del peso seco debido a las diferentes temperaturas de los hornos que usan algunos investigadores y por el contenido variable de agua de los diferentes tipos de organismos. Donde se dispone de especímenes de insectos de varios tamaños, existe un método alternativo que consiste en calibrar la biomasa viva con el ancho de cabeza, en especímenes representativos que cubren todo el rango de tamaños. El peso de los desconocidos puede entonces estimarse desde la curva. En el caso de transformaciones a log de los datos, resulta más conveniente

trabajar en (mg+1) y luego se transforman y se expresa en gramos. Se prepara una tabla resumida, como arriba.

Nota: determinar solamente la abundancia resulta fácil, puesto que no implica pesar especímenes individuales o hacer otras medidas para estimar la biomasa; sin embargo, muchas tasas de procesos en el ecosistema son proporcionales a la biomasa y no a la abundancia, de manera que monitorear datos sin estimaciones de biomasa proporciona información incompleta y, por tanto, menos informativa. Se debe mostrar riqueza de especies/morfoespecies, abundancia y biomasa en forma gráfica.

Análisis

Los análisis se deben llevar a cabo por grupo funcional, es decir, definido por su hábito alimenticio y su distribución en el perfil del suelo. Para poder establecer una comparación, la clasificación de lombrices de tierra (ya mencionada) puede aplicarse a todos los invertebrados del suelo.

Especies epigeas que viven y se alimentan en la superficie del suelo; el efecto de estos invertebrados es fraccionar y despedazar la hojarasca, y liberar nutrientes, pero no redistribuyen activamente materiales de las plantas (aunque el material despedazado sea más fácilmente transportado por el viento o el agua que el material de donde deriva). Este grupo incluye, en su mayoría, una variedad de artrópodos (hormigas, escarabajos, cucarachas, ciempiés, milpiés, cochinillas y grillos), caracoles y pequeñas lombrices de tierra completamente pigmentadas. La macrofauna activa en la superficie incluirá a los organismos muestreados en las trampas *pitfall*.

Especies anécicas son las que retiran hojarasca de la superficie del suelo a través de su actividad alimenticia. Cantidades considerables de suelo, elementos minerales y materia orgánica se redistribuyen con esta actividad y también se acompañan de efectos físicos sobre la estructura del suelo y las propiedades hídricas. Las lombrices de tierra y las termitas que no se alimentan de suelo constituyen los principales grupos dentro de esta categoría, pero también algunos arácnidos.

Especies endógeas que viven en el suelo y se alimentan de materia orgánica y de raíces muertas, ingiriendo grandes cantidades de materia mineral. Los dos grupos principales son las lombrices de tierra y las termitas que se alimentan del suelo.

Ensamblajes pueden ser comparados por la proporción relativa de especies o unidades taxonómicas (morfoespecies), las cuales pueden ser incluidas en una o más

categorías funcionales. Se recomienda probar la clasificación de un grupo funcional (GF) adicional para la macrofauna, utilizando las siguientes categorías:

Los ingenieros del ecosistema (normalmente hormigas, termitas y lombrices anécicas y endógeas). Los grandes invertebrados (> 1cm, pero ocasionalmente más pequeños) ingieren una mezcla de materia orgánica y minerales, y forman heces longevas y estables, que son complejos organominerales.

Las especies clave (termitas y posiblemente algunos transformadores de hojarasca) proveen oportunidades físicas de nichos para organismos de nivel más bajo y determinan la estructura de la comunidad de estos organismos.

Nota: los términos "ingeniero de ecosistema y especies claves" con frecuencia son utilizados, de forma incorrecta, como sinónimos.

Transformadores de hojarasca (normalmente artrópodos no sociales o semisociales, lombrices epigeas y ácaros grandes) ingieren una mezcla de materia orgánica y biomasa microbiana y forman heces holorgánicas de corta vida. Este grupo incluye invertebrados grandes (> 1cm) y medianos (0.2 a 1cm), pero algunos animales más pequeños (varios ácaros) pueden tener funciones análogas.

Macropredadores (especies predatoras >0.2 cm, normalmente procedentes de varios grupos de artrópodos).

La riqueza de especies actual puede ser estimada por medio de Sob, ACE, ICE y *EstimateS*. Los índices de diversidad y de similaridad útiles incluyen: Shannon-Wiener, Simpson, Jackknife, Jacquard y Sorensen (véase Southwood, 1978 y Krebs, 1998).

CONJUNTO MÍNIMO DE DATOS

El conjunto mínimo de datos puede ser expresado por cada punto de muestreo, por categoría de uso de suelo y por ventana de muestreo, según se explica a continuación.

Conjunto mínimo de datos por punto muestreado

De todo el muestreo

Lista de especies/morfoespecies para hormigas, termitas y escarabajos capturados con cebo.

Lista por familia de los otros escarabajos.

Lista de los otros invertebrados en la resolución taxonómica la más alta posible.

Para cada taxón se indica el método de muestreo empleado:

C = casual

T = transecto

W = *Winkler*

P = *pitfalls*

M= monolito

(Para el monolito no observar estratificaciones de 3 x 10 cm, con la excepción de lombrices de tierra).

Abundancia total en número m² de forma separada para:

Todas las hormigas (y por grupo funcional GF1, GF2, etc.).

Todas las termitas (y por GF 1, GF 2, etc., en su defecto las que se alimentan de madera o de suelo).

Todas las lombrices de tierra (además por GF 1, GF 2, etc.).

Todos los escarabajos

Otros invertebrados

Todos los invertebrados.

Desde el transecto o los transectos

Abundancia relativa de termitas. La abundancia relativa para cada GF está dada por el número de encuentros de divididos entre el número total de encuentros de todos los GFs.

Se hace un cálculo para cada GF, utilizando todas las secciones de transectos disponibles para el muestreo. Nótese que un encuentro es un evento en una sección de 5 m del transecto; el número de encuentros, por lo tanto, varía de 0 a 4 para transectos de 20 m y de 0 a 20 para transectos de 100 m. Se pueden juntar los datos obtenidos de diferentes transectos en puntos de muestreo separados.

De las trampas Winkler

Frecuencia de especies por muestra.

Datos de abundancia para hormigas y escarabajos (número de individuos m²). En el caso de las hormigas, números totales por cada grupo funcional (GF1, GF2, etc.) también pueden estimarse.

De las trampas pitfall

Se desglosa los taxa no muestreados por otros medios (únicamente).

Conjunto mínimo de datos por uso de suelo

Las categorías de uso de suelo son anotadas y cuando esto no es posible se clasifican de acuerdo con la intensidad de uso de suelo.

De todo el muestreo

Listas de especies/morfoespecies para hormigas, termitas, lombrices de tierra y escarabajos capturados con cebos.

Lista de familias para los demás escarabajos

Lista de invertebrados en la resolución taxonómica la más alta posible

Para cada taxón se indica el método de muestreo empleado, utilizando las mismas claves que las especificadas anteriormente: C= Casual, T = Transecto, W= Winkler, P= Pitfalls y M= Monolito

De los monolitos

Es necesario proveer la abundancia media como:

- a) Número de individuos $m^2 \pm SD$
- b) Media geométrica $\pm 95\%$ de intervalo de confianza
- c) Media aritmética $\pm 95\%$ de intervalo de confianza donde n = número de puntos por uso de suelo, separado para hormigas (y para grupos funcionales GF1, GF 2, etc.), todas las termitas (y para los grupos GF 1, GF 2, etc. o en su defecto las que se alimentan de madera o de suelo), todas las lombrices de tierra (y por grupos GF 1, GF 2, etc.), todos los escarabajos, otros invertebrados y todos los invertebrados (igual a lo indicado para datos mínimos por punto de muestreo).

De los transectos

Abundancia relativa media de termitas GF 1, GF 2, etc., como $\% \pm SD$, donde n = número de puntos por uso de suelo.

De las trampas Winkler

Abundancia media de hormigas (y como GF 1, GF 2, etc.) como individuos $m^2 \pm SD$, donde n = número de puntos por uso de suelo.

Abundancia media de escarabajos como individuos $m^2 \pm SD$.

Conjunto mínimo de datos por ventana de muestreo

De todos los métodos de muestreo

Recambio de especies a lo largo del gradiente como la β de Whittaker, ejemplo Diversidad β .

Para todas las abundancias medias totales y las abundancias medias relativas de los GF

Correlación con parámetros individuales del gradiente, incluyendo los resultados de intensificación de uso de suelo.

El uso de datos crudos de abundancia y de biomasa en la interpretación de la función del ecosistema resulta controversial. Por ejemplo, se dice que la abundancia de individuos no se debe usar en el caso de hormigas porque son insectos sociales que se organizan en colonias formadas por miles de individuos que se alimentan en grupos; si el muestreo se hace en una colonia, el cálculo retrospectivo hasta llegar a la densidad numérica, será sobreestimada (Colwell y Coddington, 1994). La frecuencia de especies por muestreo presenta un parámetro alternativo. De manera similar, se argumenta que los organismos se deben asignar únicamente como ingenieros del ecosistema, cuando su abundancia o biomasa lo justifique, en base de lugar a lugar; no obstante, existen contra argumentos de que los insectos sociales pueden evaluarse correctamente en cuanto a su abundancia y biomasa, si el régimen de muestreo es suficientemente robusto (incluyendo réplicas adecuadas, muestreo anidado y estratificado ejemplo Eggleton *et al.*, 1996) y que la biomasa es tan importante para la determinación del impacto ecológico que no se puede prescindir de ella o sustituirla. Desafortunadamente, la escala del esfuerzo requerida para poder evaluar la biomasa es enorme (véase Eggleton y Bignell, 1995, Lawton *et al.*,

1998), lo que compromete la caracterización de la heterogeneidad del paisaje porque restringe el número de puntos de muestreo que pueden ser utilizados.

REFERENCIAS

- Agosti, D., Majer, J. D., Alonso L. T. y Schultz T. (eds) (2000) *Measuring and Monitoring Biological Diversity. Standard Methods for Ground-living Ants*, Smithsonian Institution, Washington, DC.
- Andersen, A. N. (1997) 'Functional groups and patterns of organization in North American ant communities: A comparison with Australia', *Journal of Biogeography*, vol. 24, pp. 433–460.
- Anderson, J. M. e Ingram, J. S. I. (eds) (1989) *Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods*, 1st edition, CAB International, Wallingford.
- Anderson, J. M. e Ingram, J. S. I. (eds) (1993) *Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods*, 2nd edition, CAB International, Wallingford.
- Barrios, E., Pashanasi, B., Constantino, R. y Lavelle, P. (2002) 'Effects of land-use system on the soil macrofauna in western Brazilian Amazonia', *Biology and Fertility of Soils*, vol. 35, pp.338–347.
- Bestelmeyer, B. T., Agosti, D., Leeanne, E., Alonso, T., Brandão, C. R. F., Brown, W. L., Delabie, J. H. C., Bhattacharya, T., Halder, G. y Saha, R. K. (2000) 'Soil microarthropods of a rubber plantation and a natural forest', *Environmental & Ecology*, vol. 3, pp. 143–147.
- Bhadauria T., Ramakrishnan, P. S. y Srivastava, K. N. (2000) 'Diversity and distribution of endemic and exotic earthworms in natural and regenerating ecosystems in the central Himalayas, India', *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 32, pp. 2045–2054.
- Blakemore, R. J. (2002) *Cosmopolitan Earthworms – An Eco-Taxonomic Guide to the Peregrine Species of the World*, VermEcology, Kippax, Australia.
- Blakemore, R. J. (2005) 'Introductory key to revised earthworm families of the world', in N. Kaneko and M.T. Ito (eds) *A Series of Searchable Texts on Earthworm Biodiversity, Ecology and Systematics from Various Regions of the World*, COE Soil Ecology Research Group, Yokohama National University, Japan, www.bio-eco.eis.ynu.ac.jp/eng/index.htm.
- Blanchart, E., Lavelle, P., Braudeau, E., Lebissonais, Y. y Valentin, C. (1997) 'Regulation of soil structure by geophagous earthworm activities in humid savanna of Côte d'Ivoire', *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 29, pp. 431–439.
- Bouché, M. M. (1977) 'Stratégies lombriciennes', in U. Lohm and T. Persson (eds) *Soil Organisms as Components of Ecosystems*, *Ecological Bulletins*, vol. 25, pp. 122–132.

- Burel, F., Baudry, J., Butet, A., Clergeau, P., Delettre, Y., Le Coeur, D., Dubs, F., Morvan, N., Paillat, G., Petit, S., Thenail, C., Brunel, E. y Lefeuvre, J.-C. (1998) 'Comparative biodiversity along a gradient of agricultural landscapes', *Acta Oecologia*, vol. 19, pp. 47–60.
- Collins, N. M. (1989) 'Termites', in H. Leith and M. J. A. Werger (eds) *Tropical Rain Forest Ecosystems*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Colwell, R. K. (2000) 'Statistical Estimate of Species Richness and Shared Species from Samples, Version 6.0b1', <http://viceroy.eeb.ucon.edu/estimates>.
- Colwell, R. K. (2005) 'EstimateS, Version 7.5: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples. Software and User's Guide', <http://viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>.
- Colwell, R. K. y Coddington, J. A. (1994) 'Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation', *Philosophical Transactions of the Royal Society (Series B)*, vol. 345, pp. 101–118.
- CSM-BGBD (2005) *Global workshop on ant and termite sampling and identification*, Tropical Soil Biology and Fertility Institute of CIAT, Nairobi, Kenya.
- Csuzdi, C. S. (1996) 'Revision der Unterfamilie Benhamiinae MICHAELSEN, 1897 (Oligochaeta: Acanthodrilidae)', *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*, vol. 72, pp. 347–367.
- Decaëns, T. y Jiménez, J. J. (2002) 'Earthworm communities under an agricultural intensification gradient in Colombia', *Plant and Soil*, vol. 240, pp. 133–143.
- Decaëns, T., Jiménez, J. J., Barros, E., Chauvel, A., Blanchart, E., Fragoso, C. y Lavelle, P. (2004) 'Soil macrofauna communities in permanent pastures derived from tropical forest or savannas', *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 103, pp. 301–312.
- Decaëns, T., Lavelle, P., Jiménez, J. J., Escobar, G. and Rippstein, G. (1994) 'Impact of land management on soil macrofauna in the Oriental Llanos of Colombia', *European Journal of Soil Biology*, vol. 30, pp. 157–168.
- Delabie, J. H. C. (1995) 'Inquilismo simultâneo de duas espécies de *Centromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae, Ponerinae) em cupinzeiros de *Syntermes* sp. (Isoptera, Termitidae, Nasutermitinae)', *Revista Brasileira De Entomologia, São Paulo*, vol. 39, pp. 605–609.
- Delabie, J. H. C. (1999) 'Comunidades de formigas (Hymenoptera: Formicidae): Métodos de estudo e estudos de casos na Mata Atlântica', *Encontro De Zoologia Do Nordeste*, vol. 12, *Feira De Santana*, Resumos Feira De Santana, Sociedade Nordestina De Zoologia, pp. 58–68.
- Delabie, J. H. C., Agosti, D. y Nascimento, I. C. (2000) 'Litter ant communities of the Brazilian Atlantic rain forest region', in D. Agosti, J. D. Majer, L. T. Alonso and T. Schultz

- (eds) *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods For Ground-living Ants*, Smithsonian Institution, Washington, DC.
- DeSouza, O. F. F. y Brown, V. K. (1994) 'Effects of habitat fragmentation on Amazonian termite communities', *Journal of Tropical Ecology*, vol. 10, pp. 197–206.
- Dlamini, C., Haynes, R. J. (2004) 'Influence of agricultural land use on the size and composition of earthworm communities in northern KwaZulu-Natal, South Africa', *Applied Soil Ecology*, vol. 27, pp. 77–88.
- Easton, E. G. (1979) 'A revision of the 'acaecate' earthworms of the *Pheretima* group (Megascolecidae: Oligochaeta): *Archipheretima*, *Metapheretima*, *Planapheretima*, *Pleinogaster* and *Polypheretima*', *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology*, vol. 35, pp. 1–128.
- Eggleton, P. y Bignell, D. E. (1995) 'Monitoring the response of tropical insects to changes in the environment: troubles with termites', in R. Harrington and N. E. Stork (eds) *Insects in a Changing Environment*, Academic Press, London.
- Eggleton, P. y Bignell, D. E. (1997) 'The incidence of secondary occupation of epigeal termite (Isoptera) mounds by other termites in the Mbalmayo Forest Reserve, Southern Cameroon, and its biological significance', *Journal of African Zoology*, vol. 111, pp. 489–498.
- Eggleton, P., Bignell, D. E., Sands, W. A., Mawdsley, N. A., Lawton, J. H., Wood, T. G. y Bignell, N. C. (1996) 'The diversity, abundance and biomass of termites under differing levels of disturbance in the Mbalmayo Forest Reserve, Southern Cameroon', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, vol. 351, pp. 51–68.
- Eggleton, P., Homathevi, R., Jeeva, D., Jones, D. T., Davies, R. G. y Maryati, M. (1997) 'The species richness and composition of termites (Isoptera) in primary and regenerating lowland dipterocarp forest in Sabah, East Malaysia', *Ecotropica*, vol. 3, pp. 119–128.
- Eggleton, P., Homathevi, R., Jones, D. T., MacDonald, J. A., Jeeva, D., Bignell, D. E., Davies, R. G. y Maryati, M. (1999) 'Termite assemblages, forest disturbance and greenhouse gas fluxes in Sabah, East Malaysia', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B*, vol. 354, pp. 1791–1802.
- Eisen, G. (1900) 'Researches in American Oligochaeta with especial reference to those of the Pacific Coast and adjacent islands', *Proceedings of the Californian Academy of Sciences*, vol. 2, pp. 87–276.
- Fragoso, C. y Rojas-Fernandez, P. (1994) 'Earthworms from Southeastern Mexico. New Acanthodrilina genera and species (Megascolecidae, Oligochaeta)', *Megadriologica*, vol. 6, pp. 1–12.

- Fragoso, C., Brown, G. G., Patron, J. C., Blanchart, E., Lavelle, P., Pashanasi, B., Senapati, B. y Kumar, T. (1997) 'Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics: The role of earthworms', *Applied Soil Ecology*, vol. 6, pp. 17–35.
- Fragoso, C., Lavelle, P., Blanchart, E., Senapati, B. K., Jiménez, J. J., Martínez, M. A., Decaëns, T., y Tondoh, J. (1999) 'Earthworm communities of tropical agroecosystems: Origin, structure and influence of management practices', in P. Lavelle, L. Brussard and P. F. Hendrix (eds) *Earthworm Management in Tropical Agroecosystems*, CAB International, Wallingford.
- Gates, G. E. (1972) 'Burmese earthworms, an introduction to the systematics and biology of Megadrile oligochaetes with special reference to South-East Asia', *Transactions of the American Philosophical Society*, vol. 62, pp. 1–326.
- Gay, F. J. y Calaby, J. E. (1970) 'Termites of the Australian region', in K. Krishna and F. M. Weesner (eds) *Biology of Termites*, Academic Press, New York.
- Gilot, C., Lavelle, P., Blanchart, E., Keli, J., Kouassi, P. y Guillaume, G. (1995) 'Biological activity of soil under rubber plantation in Côte d'Ivoire', *Acta Zoologica Fenica*, vol. 196, pp. 186–189.
- Greuter, W., McNeill, J., Barrie, F. R., Burdet, H.-M., Demoulin, V., Filgueiras, T. S., Nicolson, D. H., Silva, P. C., Skog, J. E., Trehane, P., Turland N. J. y Hawksworth, D. L. (2000) *International Code of Botanical Nomenclature (St Louis Code)*, Koeltz Scientific Books, Königstein.
- Haynes, R. J., Dominy, C. S. y Graham, M. H. (2003) 'Effect of agricultural land use on soil organic matter status and the composition of earthworm communities in KwaZulu-Natal, South Africa', *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 95, pp. 453–464.
- International Commission on Zoological Nomenclature (1999) *International Code of Zoological Nomenclature*, 4th edition, International Trust for Zoological Nomenclature, London.
- Jones, D. T. y Eggleton, P. (2000) 'Sampling termite assemblages in tropical forests: Testing a rapid biodiversity assessment protocol', *Journal of Applied Ecology*, vol. 37, pp. 191–203.
- Jones, D. T., Susilo, F.-X., Bignell, D. E., Suryo, H., Gillison, A. W. y Eggleton, P. (2003) 'Termite assemblage collapses along a land-use intensification gradient in lowland central Sumatra, Indonesia', *Journal of Applied Ecology*, vol. 40, pp. 380–391.
- Jones, D. T., Verkerk, R. H. J. y Eggleton, P. (2005) 'Methods for sampling termites', in S. Leather (ed) *Insect Sampling in Forest Ecosystems*, Blackwell, Oxford.
- Julka, J. M. (1988) *The Fauna of India and the Adjacent Countries. Megadrile Oligochaeta (Earthworms) Family Octochaetidae*, Zoological Survey of India, Calcutta.

- Krebs, C. J. (1998) *Ecological Methodology*, 2nd edition, Pearson Education, London.
- Lavelle, P. (1978) 'Les vers de terres de la savane de Lamto (Côte d'Ivoire): Peuplements, populations et fonction dans l'écosystème', Thèse de Doctorat, Université Paris VI, Laboratoire de Zoologie, Ecole Normale Supérieure 12, France.
- Lavelle, P. (1981) 'Strategies de reproduction chez les vers de terre', *Acta Oecologia – Oecologia Generalis*, vol. 2, pp. 117–133.
- Lavelle, P. (1983) 'The soil fauna of tropical savannas. II The earthworms', in F. Bourlière (ed) *Tropical Savannas*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
- Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Heal, O. y Dhillon, S. (1997) 'Soil function in a changing world: The role of the invertebrate ecosystem engineers', *European Journal of Soil Biology*, vol. 33, pp. 159–193.
- Lawton, J. H., Bignell, D. E., Boulton, B., Bloemers, G. F., Eggleton, P., Hammond, P. M., Hodda, M., Holt, R. D., Larsen, T. B., Mawdsley, N. A., Stork, N. E., Srivastava, D. S. y Watt, A. D. (1998) 'Biodiversity inventories, indicator taxa and effects of habitat modification in tropical forest', *Nature (Lond)*, vol. 391, pp. 72–76.
- Lee, K. E. (1987) 'Peregrine species of earthworms', in A. M. Bonvicini and P. Omodeo (eds) *On Earthworms: Selected Symposia and Monographs*, Unione Zoologica Italiana 2, Mucchi, Modena.
- Magurran, A. E. (2004) *Measuring Biological Diversity*, Blackwell Science, Oxford.
- Mathieu, J., Rossi, J.-P., Grimaldi, M., Mora, P., Lavelle, P. y Rouland-Lefèvre, C. (2004) 'A multi-scale study of soil macrofauna biodiversity in Amazonia pastures', *Biology and Fertility of Soils*, vol. 40, pp. 300–305.
- Moreno, E. C. y Halffter, G. (2000) 'Assessing the completeness of bat biodiversity inventories using species accumulation curves', *Journal of Applied Ecology*, vol. 37, pp. 149–158.
- Moreno, E. C. y Halffter, G. (2001) 'Spatial and temporal analysis of, and diversities of bats in a fragmented landscape', *Biodiversity and Conservation*, vol. 10, pp. 367–382.
- Ortiz-Ceballos, I. A. and Fragoso, C. (2004) 'Earthworm populations under tropical maize cultivation: The effect of mulching with velvet bean', *Biology and Fertility of Soils*, vol. 39, pp. 438–445.
- Pielou, E. C. (1996) 'The measurement of diversity in different types of biological collections', *Journal of Theoretical Biology*, vol. 13, pp. 213–226.
- Righi, G. (1971) 'Sobre a familia Glossoscolecidae (Oligochaeta) no Brasil', *Arquivos de Zoologia*, vol. 20, pp. 1–95.
- Righi, G. (1995) 'Colombian earthworms', *Studies on Tropical Andean Ecosystems*, vol. 4, pp. 485–607.

- Sims, R. W. (1980) 'A classification and the distribution of earthworms, suborder Lumbricina (Haplotaxida: Oligochaeta)', *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology*, vol. 39, pp. 103–124.
- Sims, R. W. (1987) 'A review of the Central African earthworm family Eudrilidae (Oligochaeta)', in A. M. Pagliani and P. Omodeo (eds) 'On earthworms, selected symposia and monographs', *Unione Zoologica Italiana 2*, Mucchi, Modena.
- Sims, R. W. y Easton, E. G. (1972) 'A numerical revision of the earthworm genus *Pheretima* auct. (Megascolecidae: Oligochaeta) with the recognition of new genera and an appendix on the earthworms collected by the Royal Society North Borneo Expedition', *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 4, pp. 169–268.
- Sleaford, F., Bignell, D. E., y Eggleton, P. (1996) 'A pilot analysis of gut contents in termites from the Mbalmayo Forest Reserve, Cameroon', *Ecological Entomology*, vol. 21, pp. 279–288.
- Sneath, P. H. A. (1992) *International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision*, ASM Press, Herndon, VA.
- Southwood, T. R. E. (1978) *Ecological Methods with Particular Reference to the Study of Insect Populations*, 2nd edition, Chapman and Hall, London.
- Swift, M. y Bignell, D. (eds) (2001) 'Standard methods for the assessment of soil biodiversity and land-use practice', International Centre for Research in Agroforestry, South East Asian Regional Research Programme, ASB Lecture Note 6B, Bogor, Indonesia, www.fao.org/ag/agl/agll/soilbiol/docs/manual-soil%20bioassessment.pdf.
- Terborgh, R. y Robinson, S. (1986) 'Guilds and their utility in ecology', in J. E. Kikkawa and D. Anderson (eds) *Community Ecology, Pattern and Process*, Blackwell Science, Oxford.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. y Olivier, J. M. (1997) 'ADE: A multivariate analysis and graphical display software', *Statistics and Computing*, vol. 7, pp. 75–83.
- Tondoh, E. J. y Lavelle, P. (2005) 'Population dynamics of *Hyperiodrilus africanus* (Oligochaeta, Eudrilidae) in Ivory Coast', *Journal of Tropical Ecology*, vol. 21, pp. 493–500.
- Vincent, J. P. (1969) 'Recherche sur le peuplement en Oligochète de la savane de Lamto (Côte d'Ivoire)', Thèse de 3e cycle, Université Paris VI, France.
- Wood, T. G. (1978) 'Food and feeding habits of termites', in M. V. Brian (ed) *Production Ecology of Ants and Termites*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Woodcock, B. A. (2005) 'Pitfall sampling in ecological studies', in S. Leather (ed) *Insect Sampling in Forest Ecosystems*, Blackwell, Oxford.
- Zicsi, A. (2001) 'Revision der Untergattung *Martiodrilus* (Maipure Righi, 1995) (Oligochaeta: Glossoscolecidae), Regenwürmer aus Südamerika', *Opuscula Zoologica Budapest*, vol. 33, pp. 113–131.

Zicsi, A. (2005) 'Über den heutigen Stand der Regenwurmfauna (Oligochaeta) Ekuadors mit einem Bestimmungsschlüssel der Glossoscoleciden-Arten', Regenwürmer aus Südamerika 39, *Berichte des Naturwissenschaftlicher-Medizinischer Vereins in Innsbruck*, vol. 92, pp. 95–130.

APÉNDICE 1. Claves de identificación de termitas, escarabajos y hormigas; protocolos de muestreo por región.

Región y autor	Título y referencias	Notas
HORMIGAS DEL S. E. DE ASIA Hashimoto, Y. y Homathevi, R. (2003).	'Manual for Bornean Ant (Formicidae) Identification'. Preparado por "Tools for Monitoring Soil Biodiversity in the ASEAN Region". Universidad Malais Sabah, 12-26 octubre, 2003, pp 95-162.	Clave de géneros de hormigas de Borneo (útil en el S.E. de Asia, incluyendo Indonesia). Bien ilustrada con sinopsis genérica.
HORMIGAS NEOTROPICALES Fernández, F. (2003)	'Introducción a las hormigas de la región Neotropical' Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos. Alexander von Humboldt, Bogota, Colombia, XXVI, pp. 1-398.	Publicación clave para géneros de la región Neotropical. Incluye una revisión de la biología ecológica, taxonomía y la importancia económica de las hormigas.
TERMITAS DEL S. E. DE ASIA Thapa, R. S. (1984)	'Termites of Sabah' Forest Record 12, pp. 1-374.	Trabajo estándar. Fácil de usar.
Collins, N. M. (1984).	'The termites (Isoptera) of Gunung Mulu National Park with a key to the genera known from Sarawak', Sarawak Museum Journal, vol. 30; pp. 65-87.	Clave un poco obsoleta de géneros de termitas del Norte de Borneo, de fácil manejo.
Tho, Y, P. (1992)	'Termites of peninsular Malaysia' en L.G. Kirton (ed) Malaysian Forest Records, vol. 36, pp1-244. Forest Research Institute of Malaysia, Kepong.	Disponible y económica. Bien ilustrada clave de fácil identificación para los soldados, pero no cubre toda la diversidad de animales que se alimentan del suelo, dentro del clado Termes.
Gathorne-Hardy, F. (2001).	'A review of the South-east Asian Nasutitermitinae (Isoptera Termitidae), with descriptions of one new genus and new species and including a key to genera' Journal of Natural History. vol. 35 pp. 1485-1506.	Clave moderna y de fácil interpretación, útil para Sumatra, Borneo Java y Sulawesi.

APÉNDICE 1. *Continúa.*

Región y autor	Título y referencias	Notas
Homathevi, R. (2003)	'Manual for Bornean Termites (Isoptera)' preparado por 'Tools for Monitoring Soil Biodiversity in the ASEAN Region'. Universiti Malaysia Sabah, 12-26, Octubre 2003, pp. 2-38.	Clave inédita de géneros de termitas en el S.E. de Asia, incluyendo Indonesia. Bien ilustrada, con muchas referencias que incorporan descripciones taxonómicas recientes.
Thapa, R. S. (1981).	"Termites of Sabah", Sabah Forest Record 12 pp. 1-374.	Trabajo estándar, fácil de usar.
ESCARABAJOS DE ASIA Chung, A. Y. C. (2003).	'Manual for Bornean beetle (Coleoptera) family identification', preparado por 'Tools for Monitoring Soil Biodiversity in the ASEAN Region'. Universiti Malaysia Sabah, 12-26 Octubre 2003, pp. 1-28.	Clave moderna, corta y bien ilustrada de familias con una sinopsis diagnóstica de más de 100 familias y casi 50 subfamilias.
Homathevi, R. (2006).	Training course on Arthropod preservation, curation and data management; Coleoptera, Universiti Malasia Sabah, 18-22 Septiembre, 2006.	Adaptación de Chung, 2003.
ESCARABAJOS EN GENERAL. Booth, R. G., Cox, M. L. y Madge R. B. (1990).	IIE Guides to insects of importance to Man. 3, Coleoptera. International Institute of Entomology (and Institute of CAB International). The Natural History Museum, London pp. 1-384.	Explicación detallada de la morfología y agrupaciones de escarabajos.
TERMITAS AFRICANAS Sands, W. A. (1959).	'A review of the termites of the genus' Antitermes the Ethiopian region. Bulletin of the British Museum (Natural History), vol 8, pp. 129-156	La autoridad estándar del momento para este género. Claves hasta especies, tanto para imagos como soldados.
Webb, G. C. (1961).	Keys to the Genera of the African Termites, Ibadan University Press, Nigeria. 36 p.	Clave bien ilustrada a nivel género de soldados. Un poco anticuado, de fácil manejo.
Sands W. A. (1965).	'A revision of the termite subfamily Nasutitermitinae (Isoptera, Termitidae) from the Ethiopian region', Bulletin of the British Museum (Natural History), Supplement 4, pp. 1-172.	Lo que opera actualmente sobre esta subfamilia en África. Clave de géneros de imagos y soldados.

APÉNDICE 1. *Continúa.*

Región y autor	Título y referencias	Notas
Bouillon, A. y Mathot, G. (1966).	Quel est ce termite Africain? Zooleo, vol. 1, pp. 1–115.	Clave a nivel familia de imagos y soldados. Clave hasta género para soldados y muchos géneros ilustrados de manera detallada a nivel de especies (en francés).
Ruelle, J. E. (1970)	A revision of the termites of the genus <i>Macrotermes</i> from the Ethiopian (Isoptera: Termitidae) Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology vol. 24, pp. 365–444.	Lo que opera actualmente este género, Clave de especies para imagos, soldados mayores y soldados menores.
Harris W. V. (1971).	Termites, Their Recognition and Control, Longman, London.	Clave corta; anticuada; únicamente para géneros principalmente en el contexto africano, pero recomendada para formarse.
Mitchell B. L. (1980).	'Report on a survey of the termites of Zimbabwe', Occasional Papers of the National Museums of Rhodesia, Series B., Natural Science 6, pp. 187–323.	Estudio comprensivo que incluye claves hasta géneros de soldados.
Sands, W. A. (1998).	"The Identification of Worker Castes of Termite Genera from Soils of Africa and the Middle East", CAB International, Wallingford, 500 pp.	Estudio prestigiado, muy útil para termitas subterráneas crípticas, especialmente Apicotermitinae y todas las que se alimentan del suelo; de difícil manejo.
Kambhampati, S. y Eggleton P. (2000).	'Taxonomy and phylogeny of termites', en: T. Abe, D. E. Bignell and M. Higashi (eds) Termites: Evolution, Sociality, Symbioses Ecology, Kluwer Academic Publishers, pp 1–23.	Incluye una sinopsis de familias y subfamilias en forma de clave con notas e identifica caracteres diagnósticos, utilizando imagos, obreros y soldados; no muy útil como clave, pero útil para confirmaciones.
TERMITAS NEO-TROPICALES Constantino, R. (2002).	'An illustrated key to Neotropical termite genera (Insecta: Isoptera) based primarily on soldiers', Zootaxa, vol 67, pp. 1–40.	Clave completa muy ilustrada y detallada; incluye detalles del enrollamiento del intestino y de cómo está conformada la válvula entérica para identificar algunas Apicotermitinae, más 32 referencias.

APÉNDICE 1. *Continúa.*

Región y autor	Título y referencias	Notas
CLAVES INÉDITAS DE TERMITAS Y LISTAS DE COMPROBACIÓN Wanyoni, K. (1983).	Checklist of the Species of Termites (Isoptera) Recorded from East Africa. (J. P. E. C. Darlington, ed) International Centre of Insect Physiology and Ecology.	No es una clave, pero sí un listado que identifica la distribución entre Kenia, Uganda, Tanzania y Zanzibar.
Sands W. A. y Williams, R. M. C. (sin fecha).	'Taxonomy of Termites', Centre for Overseas Pest Research.	Documento de base, eje de muchas claves privadas de museos nacionales; incluye claves hasta familias y subfamilias, imagos y soldados; reporte detallado con definiciones de características morfológicas, utilizadas en taxonomía. Bibliografía completa.
Williams R. M. C. (sin fecha).	A Key to the Genera of the Termitinae by the Soldier Caste. Centre for Overseas Pest Research.	Clave detallada y de fácil manejo para géneros de África del Oeste y Central. Excelente para entrenamiento avanzado.
DOCUMENTOS VARIADOS		
Roowal, M. L. y Chhotani, O. B. (1989).	The Fauna of India and Adjacent Countries: Isoptera (Termites), vol. I. Zoological Survey of India, Calcutta, 672 pp.	Los volúmenes I y II contienen claves hasta familias, subfamilias, géneros y especies para imagos y soldados.
Chhotani, O. B. (1997).	The Fauna of India and Adjacent Countries: Isoptera (Termites), vol. II. (Family Termitidae) Zoological survey of India, Calcutta, 801 pp.	Los volúmenes I y II cubren todo el subcontinente de la India, incluyendo Sri Lanka.
Fisher, B. (2001).	'Equipment specifications' Department of Entomology, Harvard University.	Listas de material requerido para un muestreo de hormigas con precios en \$US del 2001. No publicado.
Fisher, B. (2001).	'Guidelines for data collection for ants'. Department of Entomology, Harvard University.	Guías para caracterización del sitio y anotaciones relacionadas con el muestreo de hormigas. No publicado.
Ward, P. S. (2003).	'Ant subfamilies'. Entomology department, UC Davis.	Sinopsis ilustrada de subfamilias y su distribución, con una amplia bibliografía.

APÉNDICE 1. *Continúa.*

Región y autor	Título y referencias	Notas
Jones, D. T. (ed) 2003.	'Tools for the Rapid Assessment of Soil Invertebrate Biodiversity in the ASEAN Region', prepared for 'Tools for Monitoring Soil Biodiversity in the ASEAN Region', Universiti Malaysia Sabah, 12–26 October, 2003, pp. 1–39.	Revisión moderna y completa de la naturaleza de la biodiversidad del suelo y métodos de evaluación rápidos para hormigas, termitas, escarabajos del suelo, lombrices de tierra diplópodos, Isópteros y arañas (Araneae). Bibliografía amplia y actual; lectura obligatoria.
(Anónimos, sin fecha).	"Glossary of morphological characters used in ant taxonomy". Department of Entomology, Harvard University Entomology, Harvard University	Completo, pero sin ilustraciones. No publicado.

APÉNDICE 2. Trabajos taxonómicos con claves de especies de algunos géneros neotropicales. Las claves hasta género son dadas en Krishna (1961; únicamente Kalotermitidae), Mill (1983) y Constantino (1999, 2002).

Género	Referencia	Contenido
KALOTERMITIDAE		
<i>Cryptotermes</i> <i>Eucryptotermes</i> <i>Procryptotermes</i>	Bacchus (1987) Scheffrahn y Krecek (1999). Constantino (1997). Scheffrahn y Krecek (2001).	Revisión mundial con revisión de claves de las especies antillanas con claves hasta la diagnosis de los soldados; Revisión de mapas de distribución de especies del Nuevo Mundo con clave de soldados y alados.
RHINOTERMITIDAE		
<i>Heterotermes</i>	Constantino (2001).	Clave de soldados de América del Sur.
TERMITIDAE		
<i>Amitermes</i>	Light (1932).	Revisión y claves (anticuado).
<i>Anoplotermes</i>	Snyder (1926).	Clave de alados (anticuado).
<i>Atlantitermes</i>	Constantino y DeSouza (1997).	Clave de soldados.
<i>Cornitermes</i>	Emerson (1952).	Revisión y claves.
<i>Cyranotermes</i>	Constantino (1990).	Clave de soldados.
<i>Cyrtillotermes</i>	Fontes (1985).	Clave de soldados.
<i>Labiotermes</i>	Araujo (1954).	Clave de soldados de <i>Paracomitermes</i> (anticuado).
	Emerson y Banks (1965).	Revisión de <i>Labiotermes sensu stricto</i> , con claves.
	Constantino <i>et al.</i> (2006).	Revisión y claves.
<i>Nasutitermes</i>	Holmgren (1910).	Revisión y claves (anticuado y en alemán).
<i>Parvitermes</i>	Scheffrahn and Krecek (1993).	Claves de soldados de especies de Las Antillas (anticuado).
<i>Procornitermes</i>	Emerson (1952).	Revisión y claves.
	Cancelló (1986).	Revisión y claves de soldados (en portugués).
<i>Neocapritermes</i>	Krishna y Araujo (1968).	Revisión y claves.
<i>Parvitermes</i>	Scheffrahn y Krecek.	Claves de soldados de especies de Las Antillas (anticuado).

APÉNDICE 2. *Continúa.*

Género	Referencia	Contenido
<i>Procornitermes</i>	Emerson (1952).	Revisión y claves.
	Cancello (1986).	Revisión y claves de soldados (en portugués).
<i>Rhynchotermes</i>	Fontes (1985).	Claves de soldados (anticuado).
<i>Rotunditermes</i>	Fontes y Bandeira (1979).	Claves de soldados.
<i>Syntermes</i>	Emerson (1945) .	Revisión y claves (anticuado).
	Constantino (1995).	Revisión y claves.

APÉNDICE 3. Literatura especializada en termitas neotropicales

- Araujo, R. L. (1954) 'Notes on the genus *Paracornitermes* Emerson 1949 with description of two new species (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae)', *Revista Brasileira de Entomologi*, vol. 1, pp. 181–189.
- Bacchus, S. (1987) 'A taxonomic and biometric study of the genus *Cryptotermes* (Isoptera: Kalotermitidae)', *Tropical Pest Bulletin*, vol. 7, pp. 1–91.
- Cancello, E. M. (1986) 'Revisão de *Procornitermes* Emerson (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae)', *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, vol. 36, pp. 189–236.
- Constantino, R. (1990) 'Notes on *Cyranotermes* Araujo with description of a new species (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae)', *Goeldiana Zoologi*, vol. 2, pp. 1–11.
- Constantino, R. (1995) 'Revision of the Neotropical termite genus *Syntermes* Holmgren (Isoptera: Termitidae)', *University of Kansas Science Bulletin*, vol. 55, pp. 455–518.
- Constantino, R. (1997) 'Notes on *Eucryptotermes* with a new species from central Amazonia (Isoptera: Kalotermitidae)', *Sociobiology*, vol. 30, pp. 125–131.
- Constantino, R. (2001) 'Key to the soldiers of South American *Heterotermes* with a new species from Brazil (Isoptera: Rhinotermitidae)', *Insect Systematics and Evolution*, vol. 31, pp. 463–472.
- Constantino, R. (2002) 'An illustrated key to Neotropical termite genera (Insecta: Isoptera) based primarily on soldiers', *Zootaxa*, paper 67, pp. 1–40.
- Constantino, R. y DeSouza, O. F. F. (1997) 'Key to the soldiers of *Atlantitermes* Fontes 1979, with a new species from Brazil (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae)', *Tropical Zoology*, vol. 10, pp. 205–213.
- Constantino, R., Acioli, A. N., Schmidt, K., Cuezco, C., Carvalho, S. H. y Vasconcellos, A. A. (2006) 'A taxonomic revision of the Neotropical termite genera *Labiotermes* Holmgren and *Paracornitermes* Emerson (Isoptera: Termitidae: Nasutitermitinae)', *Zootaxa*, paper 1340, pp. 1–44.
- Emerson, A. E. (1945) 'The Neotropical genus *Syntermes* (Isoptera: Termitidae)', *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 83, pp. 427–472.
- Emerson, A. E. (1952) 'The Neotropical genera *Procornitermes* and *Cornitermes* (Isoptera, Termitidae)', *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 99, pp. 475–540.
- Emerson, A. E. y Banks, F. A. (1965) 'The Neotropical genus *Labiotermes* (Holmgren): Its phylogeny, distribution and ecology (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae)', *American Museum Novitates*, no 2208, pp. 1–33.

- Fontes, L. R. (1985) 'New genera and new species of Nasutitermitinae from the Neotropical region (Isoptera, Termitidae)', *Revista Brasileira de Zoologia*, vol. 3, pp. 7–25.
- Fontes, L. R. y Bandeira, A. G. (1979) 'Redescription and comments on the Neotropical genus *Rotunditermes* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae)', *Revista Brasileira de Entomologia*, vol. 23, pp. 107–110.
- Holmgren, N. (1910) 'Versuch einer Monographie der amerikanischen *Eutermes* – Arten', *Jahrbuch der Hamburgischen Wissenschaftlichen Anstalten*, vol. 27, pp. 171–325.
- Krishna, K. (1961) 'A generic revision and phylogenetic study of the family Kalotermitidae (Isoptera)', *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 122, pp. 303–408.
- Krishna, K. y Araujo, R. L. (1968) 'A revision of the Neotropical genus *Neocapritermes* (Isoptera, Termitidae, Nasutitermitinae)', *Bulletin of the American Museum of Natural History*, vol. 138, pp. 84–138.
- Light, S. F. (1932) 'Contribution toward a revision of the American species of *Amitermes* Silvestri', *University of California Publications in Entomology*, vol. 5, pp. 335–414.
- Mill, A. E. (1983) 'Generic keys to the soldier caste of New World Termitidae (Isoptera: Insecta)', *Systematic Entomology*, vol. 9, pp. 179–190.
- Scheffrahn, R. H. y Krecek, J. (1993) '*Parvitermes subtilis*, a new subterranean termite (Isoptera: Termitidae) from Cuba and the Dominican Republic', *Florida Entomologist*, vol. 76, pp. 603–607.
- Scheffrahn, R. H. y Krecek, J. (1999) 'Termites of the genus *Cryptotermes* Banks (Isoptera: Kalotermitidae) from the West Indies', *Insecta Mundi*, vol. 13, pp. 111–171.
- Scheffrahn, R. H. y Krecek, J. (2001) 'New world revision of the termite genus *Procrypto-termes* (Isoptera : Kalotermitidae)', *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 94, pp. 530–539.
- Snyder, T. E. (1926) 'Termites collected on the Mulford Biological Exploration to the Amazon Basin 1921–1922', *Proceedings of the US National Museum*, vol. 68, pp. 1–76.

CAPÍTULO 4

Collembola, acari y otra mesofauna del suelo: el método Berlese

Agus Karyanto, Cahyo Rahmadi, Elizabeth Franklin,
Francis-X. Susilo y Jose Wellington de Morais

INTRODUCCIÓN

La mesofauna está conformada por animales cuyo tamaño de cuerpo oscila entre 0.2 y 2.0 mm, y cuya abundancia no puede ser evaluada con exactitud por medio de la selección manual del suelo. Enchytraeidae, Acari (ácaros), Collembola (colémbolos), Protura, Pauropoda y otros Nematodos son típicos representantes de la mesofauna; sin embargo, formas de larvas de especies de macrofauna también caen dentro del rango de tamaño de mesofauna. El muestreo de la mesofauna (y otra biota del suelo) se encuentra integrado como parte de la estrategia global del inventario de la biodiversidad bajo del suelo, descrito en el Capítulo 2. En cada punto de muestreo, los núcleos de suelo se localizan en dos círculos concéntricos, a 3 m y 6 m de radio del monolito, respectivamente, y se complementan con *pitfall*, localizadas a por lo menos 14 m del centro del monolito. La mesofauna se colecta utilizando dos métodos de muestreo: a) una muestra compuesta que contiene varios núcleos de suelo y hojarasca extraída de la superficie, bien por el método Berlese-Tullgren o por el de Berlese modificado; b) del contenido líquido de las trampas *pitfall*. Los núcleos de suelo, en principio, sirven para colectar mesofauna que habita en el suelo mineral, por debajo de la hojarasca de la superficie y en la hojarasca en sí, mientras las trampas *pitfall* se utilizan para colectar los que habitan en la superficie del suelo.

El método Berlese es un sistema de extracción por embudo para separar los pequeños artrópodos del suelo, fue desarrollado por Antonio Berlese, a finales del siglo XIX. En este sistema circula agua caliente entre las paredes dobles de la tón del embudo (o embudos), de manera que la muestra se seca lentamente. En 1918, Tullgren modificó el método Berlese, reemplazando la envoltura de agua por un foco de luz eléctrica. El método *pitfall* (Capítulo 3,) es suficientemente eficaz como para poder capturar colémbolos que viven en la superficie del suelo (edáficos); sin embargo, no resulta útil para coleccionar ácaros oribátidos (Acari: Oribatida) porque estos animales, normalmente, son sedentarios (con la excepción de algunas familias como Galumnidae y Scheloribatidae), en contraste con los grupos más oportunistas como los colémbolos. Se sugiere que para un muestreo normal ambas extracciones de embudo y *pitfall* deben emplearse de manera conjunta.

Los ácaros oribátidos (también conocidos como Cryptstigmata a los que se refieren como ácaros escarabajos o ácaros de caja) son artrópodos numéricamente dominantes en los horizontes orgánicos de la mayoría de los suelos; su densidad puede alcanzar cientos de miles de individuos por m², con una diversidad de especies también muy alta y, en suelos no perturbados, se pueden encontrar entre 50 y 100 especies (Norton, 1990). Estos ácaros se alimentan de materia de plantas vivas o muertas y de carroña; asimismo, forrajean en hongos y algas, y algunos son predadores, por ejemplo, se alimentan de nematodos vivos (Siepel, 1990). Sus heces fecales proporcionan una amplia superficie para la descomposición primaria por hongos y bacterias y, a su vez, constituyen un componente integral de la estructura del suelo; después de muertos, se convierten en un importante desecho nitrogenado. Debido a su papel regulador en la descomposición y el reciclaje de nutrientes, al igual que en la formación de la estructura de suelo, su abundancia, composición de especies y diversidad en un hábitat específico son buenos indicadores de un suelo "sano" (Minor, 2004). Lo anterior es aplicable para los grupos mayores de microartrópodos del suelo o a partir de las proporciones de abundancia y diversidad entre los grupos de mesofauna del suelo.

MÉTODOS DE MUESTREO

Los protocolos aquí descritos abordan principalmente los de los ácaros y colémbolos presentes en los horizontes minerales y en la hojarasca. El principio es coleccionar pequeños núcleos o bloques y combinarlos para hacer una sola muestra compues-

ta, la cual es entonces sub-muestreada por extracción por el método de Berlese-Tullgren. De manera alternativa, se utilizan tres o cuatro muestras compuestas y no sólo una. Las muestras de suelo, con o sin hojarasca, se colectan en el campo, utilizando un sacabocados. Este aparato mide 3.5 x 3.5 cm de ancho y 10 cm de alto, y toma muestras a una profundidad de hasta 5cm que posteriormente se transfieren a un recipiente de plástico de 300 ml de volumen (Figuras 4.1a y b). El siguiente paso es almacenar las muestras en cajas grandes para transportarlas hasta el laboratorio. De manera alternativa, las muestras del suelo pueden ser colectadas en muestras de 3.5 x 3.5 x 5 cm de profundidad, utilizando una pequeña cuchara que tome un volumen constante de aproximadamente 100 ml. Así, el suelo de 12 sub-muestras se coloca entonces en una bolsa de 5 kg como una muestra compuesta.

La muestra compuesta de suelo se divide en 10 bolsas de *nylon*, con un promedio de un kilo por bolsa, se etiquetan y se transfieren a un costal de tela de 30 x 35 cm de tamaño, para evitar que la mesofauna muera. Se ha observado que los costales de tela son muy eficientes para almacenar temporalmente y transportar las muestras durante largas distancias y tiempos, porque la tela permite que circule el aire, evitando que la temperatura se eleve. No se debe usar un costal de plástico porque la temperatura del suelo puede aumentar sustancialmente, lo que provocaría la muerte de la mesofauna antes de su extracción. De la misma manera, se debe evitar que la muestra se exponga a sol directo durante el encostado en el campo; también se deben proteger de la lluvia durante el traslado, porque si éstas se mojan o humedecen demasiado, la fauna también puede morir. Al llegar al campo de base o laboratorio, se colocan todos los costales de tela bajo techo, de acuerdo con su localidad de muestreo. Enseguida se empacan las muestras en una caja de cartón, con una capa de papel para mantener un ambiente de humedad estable dentro de la caja. Ahora las muestras estarán listas para su traslado al laboratorio, donde serán identificadas; para ello es recomendable utilizar un vehículo con aire acondicionado. Dichas muestras deben permanecer alejadas del calor del motor del vehículo y de su sistema de escape. Si se transporta la muestra sin aire acondicionado, ésta deberá situarse en el asiento del pasajero; tanto la luz solar como el calor del motor, son dañinos para los animales que se encuentran en la muestra. Una vez en el laboratorio, el suelo deberá someterse de inmediato a su extracción.

Figura 4.1 Sacabocados de metal para muestrear la mesofauna en la hojarasca y en el suelo mineral; a) se deposita el contenido de cada núcleo en un vaso de plástico etiquetado, utilizando una pequeña cuchara o cuchillo de campo; b) se utilizan guantes como precaución contra enredaderas, hormigas, arañas y otros artrópodos. Cortesía de: J.W. Morais y E. Franklin.



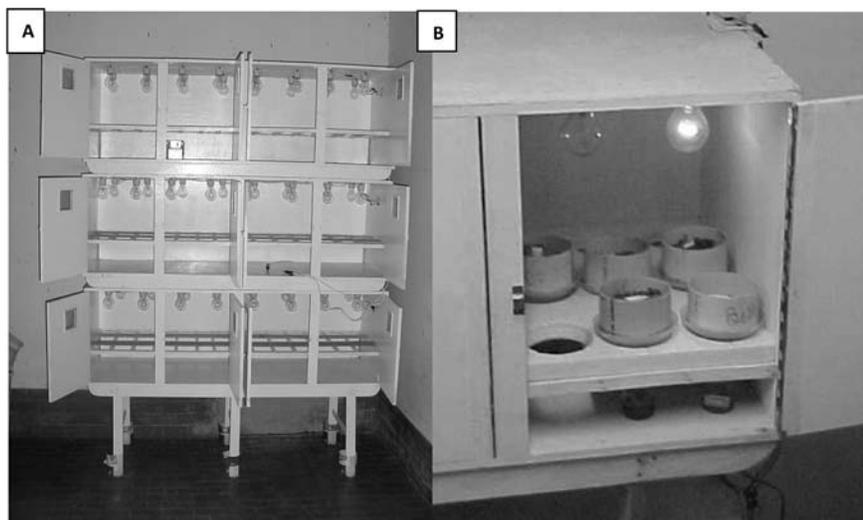
EXTRACCIÓN

Método Berlese-Tullgren

El aparato Berlese-Tullgren (Figura 4.2) es utilizado para extraer la mesofauna activa que habita en las muestras de suelo y en la hojarasca; se mantiene el aparato en el laboratorio del campo de base, cerca del área de referencia. La manera ideal es utilizar un contenedor de madera de alrededor de 160 x 50 cm, dividido en compartimentos superiores e inferiores; cada compartimento contará con un marco para sostener los embudos de plástico (Figura 4.2 a) al igual que puertas, para evitar que otros insectos voladores pasen a formar parte de la muestra. Se coloca un tamiz (de 8 cm de diámetro y 5 cm de altura) con muestras de suelo y hojarascas encima del embudo. El tamaño de malla del tamiz, de 1.5 mm, deberá contener cuatro agujeros de 4 mm de diámetro para permitir que animales mayores escapen hacia abajo. Se calientan ligeramente los embudos, utilizando para ello focos eléctricos (los de 25 W son ideales), aunque también se podrían usar los de 40 W; éstos se suspenderán a 14 cm por encima del tamiz; se debe incrementar el calentamiento de manera gradual cada día, dejando los focos encendidos cada vez

durante mayor tiempo, por un periodo de hasta 8 días, para evitar que el material de la muestra se seque demasiado rápido, esto inmovilizará a la mesofauna antes de que se escape. El principio básico del aparato Berlese-Tullgren es que los organismos de suelo responden al incremento de temperatura o sequedad en el suelo migrando hacia abajo hasta que finalmente caen a través de la malla, en una botella que los recibe hasta la base del embudo, la cual contiene un conservador, por lo tanto, para una mayor efectividad, el embudo deberá presentar una superficie lisa y una fuerte pendiente, de modo que los animales que caen por la malla lo hagan de manera rápida hasta llegar a la botella que los recibe. Se ajusta la posición de la lámpara para asegurar que la temperatura del suelo suba gradualmente, evitando así que las especies que se mueven con mayor lentitud queden atrapadas en las capas secas y duras del suelo.

Figura 4.2 a) contenedor de apoyo para embudos Berlese-Tullgren; b) sistema Berlese-Tullgren en operación.



Nota: nótese que las patas están sumergidas en agua para evitar la invasión de hormigas y de otros insectos. Cortesía de: J.W. Morais y E. Franklin.

Típicamente, la temperatura de la muestra se aumenta gradualmente de 27°C hasta aproximadamente 40-45°C. Las muestras se quedan en el aparato hasta que estén completamente secas, es decir, hasta que mantengan un peso seco constante que generalmente tarda unos 8 días; si se dejan durante más tiempo nacen los

huevos y las formas inmaduras se vuelven adultos, por lo que las muestras serán menos representativas. Como líquido conservador, generalmente, se utiliza formol al 4% o etanol, al 96%.

El método Berlese modificado

Cuando no se cuenta con electricidad, el embudo se coloca sin luz y el proceso de calentamiento-secado se lleva a cabo simplemente a temperatura ambiente; un embudo de aluminio modificado de Berlese, en donde se coloca un tamiz con una malla de 2 x 2 mm (malla 13), que se muestra en la figura 4.3, es el adecuado para el secado sin electricidad. Un sistema Berlese que opera sin luz muchas veces permite una mejor extracción, aunque tomará más tiempo; en este caso, el tiempo de espera será de 7 a 14 días, dependiendo de las condiciones de humedad inicial del suelo. El envase receptor se llena con etanol al 96% para su conservación y durante intervalos de 4 a 5 días se cambia el envase receptor. El aparato Berlese *sensu stricto* puede transformarse en un modelo Berlese-Tullgren, con la colocación de una bombilla de 10 a 40W, arriba de las muestras de suelo; éste se cerrará con una tapa para prevenir la entrada de otros insectos. En la presencia de luz, el tiempo de incubación (tiempo necesario para extraer la fauna del suelo) es aproximadamente de 4 a 5 días. El uso de un foco puede atraer insectos nocturnos, especialmente si el embudo Berlese no está perfectamente cerrado. Para evitar lo anterior, el agujero de ventilación de la tapa deberá cerrarse durante la noche.

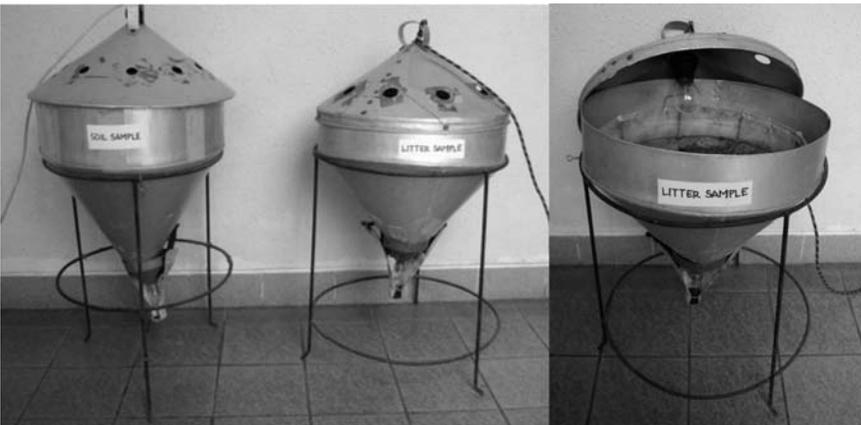
A pesar de una eficiencia menor, cuando se compara con otros métodos de muestreo, el sistema Berlese-Tullgren y, en cierta manera, el de Berlese, es uno de los más usuales para la extracción en la evaluación de la diversidad y densidad de microartrópodos del suelo (André *et al.*, 2002). Una ventaja de dichos sistemas es que se pueden operar a diferentes escalas, al tiempo que utilizan el mismo principio para extraer un solo núcleo o una muestra conglomerada mayor; lo único que se requiere es un embudo más grande y un tiempo de secado más largo. Son baratos y sencillos; pueden moverse con facilidad desde el lugar del muestreo y ser ajustados para acomodar un gran número de muestras, aun en regiones remotas (Frankin y Morais, 2006). Asimismo, el equipo completo requerido es barato y puede ser fácilmente improvisado (Figura 4.5).

Figura 4.3 Embudos Berlese llenos de suelo y hojarasca.



Fuente: cortesía del Dr. Y. R. Suhardjono LIPI Bogor.

Figura 4.4 Embudo Berlese modificado, hecho de aluminio, de 50cm de altura, con embudo superior de 40 cm de diámetro.



PROCESOS DE ACLARADO Y MONTAJE DE ESPECÍMENES

Para su identificación, los especímenes de mesofauna son montados sobre lamini-llas, después de su aclarado. El proceso de montaje debe realizarse bajo un micros-

Figura 4.5 Equipo básico requerido para llevar a cabo extracciones Berlese-Tullgren núcleo por núcleo. Cortesía de: M.R. Coelho.



copio de disección; la observación de la morfología, normalmente, requiere de un microscopio compuesto.

Proceso de aclarado

El aclarado consiste en volver más transparente el tejido de los especímenes, mediante el lavado y removido de las grasas y pigmentos del cuerpo. Para ello, normalmente se usa una solución de Nesbitt (su composición se describe a continuación), aunque el hidróxido de potasio (KOH) y el ácido láctico son alternativas efectivas. Los especímenes pueden ser aclarados con un 15% de KOH, durante dos a cinco minutos, con o sin calentamiento, aunque Greenslade *et al.*, (2008) propusieron una solución de KOH 10% durante 1 a 5 minutos, dependiendo del pigmento y de la grasa del cuerpo del animal. Después de la inmersión en KOH, se transfieren los especímenes a una solución de cloral fenol, durante unos minutos, hasta neutralizar la reacción. Un método más simple de aclarado es utilizando ácido láctico, en donde se sumergen y calientan durante los diferentes periodos de tiempo, dependiendo del tamaño; este método es más barato, fácil y seguro, y da buenos resultados (Greenslade *et al.*, 2008). Los taxa con cutículas delicadas, como algu-

nos Diplura, Protura y Pauropoda no deben meterse en una solución concentrada de ácido; estos especímenes deberán sumergirse en una mezcla de 50% de ácido láctico/etanol durante unas horas, sin calentamiento. En cada caso se debe regular y controlar el tiempo; si no se hace, los especímenes pueden destruirse o desarticularse. Para un almacenaje permanente, los especímenes deben transferirse a otro medio, porque el ácido láctico continúa aclarándolos y ablandándolos. Después de su identificación, muchos ácaros oribátidos se guardan en viales etiquetados, con alcohol 70%, al que se añade un 5% de glicerina. Los ácaros también pueden aclararse y conservarse trasladándolos del alcohol a un medio de Hoyer. Los ácaros esclerotizados pueden ser aclarados con lactofenol (compuesto por ácido láctico, cristales de fenol y agua destilada, en proporciones 50:25:25) o simplemente con ácido láctico (frío o caliente).

Montaje

No existen métodos totalmente satisfactorios para el montaje (Greenslade *et al.*, 2008). La posición de los especímenes sobre el portaobjetos difiere entre los órdenes: por ejemplo, los colémbolos Poduromorpha se deben colocar en posición dorso-ventral, mientras que para los Entromobryomorpha, Symphypleona y Neelipleona, la posición indicada es látero-lateral.

Algunos grupos necesitan ser disecados o disectados antes del montaje, con el propósito de identificarlos viendo la quetotaxia de cada parte, como característica clave. De nuevo, utilizando el ejemplo de los colémbolos, se recomienda la disección en el caso de Symphypleona y de las Paronellidae y Entomobryidae mayores (6 a 8mm). La disección se realiza en varias partes del cuerpo, tales como cabeza, patas, fúrcula, tubo ventral y en los segmentos V y VI abdominales. Las partes diseccionadas del cuerpo de los Entromobryomorpha deberán colocarse de forma dorso-ventral sobre el portaobjetos, mientras que las partes del cuerpo de los Symphypleona grandes se montarán de la siguiente manera: cabeza (dorso-ventral), abdomen grande (látero-lateral), abdomen pequeño y fúrcula (dorso-ventral). En el caso de especímenes mutilados, es aconsejable montar todas las partes del cuerpo en una sola preparación, para que puedan ser bien identificados.

Para dicho montaje se requiere de una solución Berlese. Las especímenes son montados en laminillas y secadas en el horno a 70°C durante, por lo menos, siete días. Otras soluciones, por ejemplo, el medio líquido Hoyer, también pueden usarse para el proceso de montaje (Tabla 4.1). Normalmente, en el

caso de ácaros de suelo, se hace un montaje temporal, aunque también se puede usar para otros grupos de mesofauna. El espécimen se traslada a unas gotas de ácido láctico o glicerina en un portaobjetos excavado. Se coloca de manera parcial un cubreobjetos sobre la depresión y se empuja el espécimen por debajo del recubrimiento, hacia el borde de la depresión. El espécimen puede rodarse suavemente hasta conseguir la orientación deseada. Trave (1965), Krantz (1978) y Norton (1990), ofrecen una buena discusión de fondo acerca de cómo aclarar y montar ácaros.

TABLA 4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA PARA ACLARAR Y MONTAR ESPECÍMENES.

Para aclarar especímenes solución Nesbitt's 10% KOH ó NaOH	25 ml de agua destilada, 40 g de hidrato de cloro y 2.5 ml de ácido hidroclicórico
Montaje de especímenes : medio líquido de Berlese	20 ml de agua destilada, 15 g de goma arábica, 50 g de hidrato de cloro, 5 ml de glicerina, 10 g de glucosa y 5 ml de ácido acético glacial.
Montaje de especímenes: medio líquido de Hoyer	50 ml de agua destilada, 30 g de goma arábica, 200 g de hidrato de cloro y 20ml de glicerina.

Nota: montaje Berlese: calentar a 70°C durante 7 días. El medio líquido de Hoyer es un agente temporal y no se endurece con calentamiento, pero las preparaciones pueden hacerse semipermanentes sellando el recubrimiento con barniz de uñas transparente.

IDENTIFICACIÓN DE ESPECÍMENES Y ANÁLISIS DE DATOS

Identificación

La mayoría de los invertebrados del suelo pueden identificarse hasta orden o familia con la ayuda de trabajos estándares de referencia, tales como los de Bachelier (1978) y Dindal (1990); sin embargo, en el caso de la mayoría de los grupos de artrópodos de suelo, una identificación más allá de este nivel, resulta difícil. A nivel de especies, la pericia taxonómica quizás sea el factor determinante en la selección de una taxa para su estudio posterior. Se encuentran disponibles varias páginas en la *web*, de donde se pueden obtener guías de ayuda para la identificación, donde se indican las características distintivas de varios grupos de invertebrados. Por ejemplo, www.cals.ncsu.edu/course/ent591k/kwikey1.htm o <http://soilbugs.massey.ac.nz/key.php>; esta última dirección también concentra la literatura principal,

permitiendo así, la identificación a nivel género y/o especies. Bachelier (1978) ofrece buena información de fondo dentro de las amplias unidades taxonómicas de artrópodos del suelo e incluye guías ilustradas para varios grupos. Un estudio completo de la biología, taxonomía y ecología de grupos de la biota del suelo, es mostrado en Dindal (1999). El libro se escribió para un fácil manejo, por lo que es recomendable tanto para principiantes como para profesionales, ya que contiene guías de identificación ilustradas, por lo menos, hasta nivel de familia y, algunas veces, de especies para algunos grupos como Nematoda, Enchytraeidae, Escorpiones, Araneae, Pseudoscorpionida, Opiliones, Mites, Isopoda, Chilopoda, Paupoda, Symphyla, Protura, Diplura, Collembola, Isóptera, Coleoptera, Diptera y Hymenoptera. Asimismo, Adis (2002) ofrece guías ilustradas para principiantes y cualquier persona interesada en Arachnida y Myriapoda Neotropicales. El libro contiene claves de identificación para todas las clases, órdenes, familias, algunos géneros y listas de especies terrestres conocidas, al igual que referencias de la taxonomía actual de estos grupos.

Los subórdenes de ácaros y muchas familias de colémbolos son de fácil identificación, una vez conocida su morfología y características básicas (Crossley y Coleman, 1999). La base de identificación y clasificación se encuentra resumida en las referencias que se citan a continuación; por ejemplo, la identificación de colémbolos, a nivel genérico, se encuentra disponible en Greenslade *et al.*, 2008. Publicaciones de Yoshii (1981a, 1981b, 1982a, 1982b y 1983) pueden utilizarse para identificar colémbolos a nivel especies, en las familias Entomobryidae y Paronellidae. Los recursos para la identificación de ácaros, a nivel familia, están disponibles en Kranz (1978) y Dindal (1990), Balogh (1972), Balogh y Mahunka (1983) y Balogh y Balogh (1992), quienes ofrecen guías y figuras a nivel genérico para ácaros que pertenecen a la suborden Oribatida. Desafortunadamente, son escasas las guías específicas para este grupo en los trópicos; Balogh y Balogh (1990) ofrecen una breve caracterización y claves de identificación para ácaros oribátidos que habitan en la región neotropical, al igual que una lista de comprobación y bibliografía de especies descritas en esta área.

Análisis de datos

El número de individuos en cada orden y en cada lugar, es utilizado para estimar su abundancia. Las muestras colectadas, utilizando pequeños núcleos o bloques, son combinadas para crear una muestra compuesta que se somete a extracción,

utilizando el método Berlese-Tullgren. Este procedimiento mejora la eficiencia de la extracción porque maximiza las posibilidades de captura de grupos o especies representativos. Los datos obtenidos deben, por lo tanto, incluir la riqueza de especies en el caso de los taxa seleccionada para la identificación a nivel especies. Dado que los grupos de lugares similares ofrecen una fauna similar y que la mayoría de animales del suelo pueden distribuirse en los grupos funcionales básicos (Ruf *et al.*, 2003), los taxa escasamente conocidos también se pueden clasificar a niveles taxonómicos más altos (orden o familia), o bien, de acuerdo con su función ecológica mayor (detritívoros, fitófagos, predadores, etc.). Se ha demostrado que datos a nivel género y familia, ejemplo: ácaros oribátidos, también pueden detectar los efectos de la perturbación con poca pérdida de información y llegar a ser una herramienta preliminar para describir patrones y sucesiones en ecosistemas del suelo perturbado por humanos (Caruso y Migliorini, 2006).

La comparación de la composición de taxa entre usos de suelo debería llevarse a cabo utilizando un análisis jerárquico de agrupación y la unión promedio de agrupaciones de los datos transformados. El número de individuos normalmente se transforma de forma logarítmica $\log: x' = \log_{10} (x+1)$ para evitar dar mayor peso a las especies dominantes en el análisis de datos (Ludwig y Reynolds, 1988). El programa DIVERS, del paquete de metodología ecológica para Windows, puede usarse para calcular los índices de riqueza de especies, un nuevo estimador estadístico que toma en cuenta especies compartidas no detectadas, basada en la correspondencia estadística entre combinaciones de *singletons* y de otras especies raras (estimador de abundancia Chao-Sørensen) fue desarrollada por Chao *et al.*, 2005, 2006. Este índice resulta especialmente útil para eliminar invertebrados hiper-diversos, con numerosas especies raras, tales como colémbolos, ácaros oribátidos y hormigas. Este estimador, junto con otros índices de diversidad, pueden ser calculados utilizando el programa *EstimateS* (Colwell, 2006). También puede llevarse a cabo un análisis adicional como rarefacción y estadística multivariada.

REFERENCIAS

- Adis, J. (2002) *Amazonian Arachnida and Myriapoda*, Pensoft, Sofia-Moscow.
- André, H. M., Ducarme, X. y Lebrun, Ph. (2002) "Soil biodiversity: Myth, reality or conning?" *Oikos*, vol. 96, pp. 3–24.
- Bachelier, G. (1978) "La faune des sols, son écologie et son action", *Initiations et Documents Techniques*, no 38, ORSTOM, Paris.

- Balogh, J. (1972) *The Oribatid Genera of the World*, Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Balogh, J. y Balogh, P. (1990) 'Oribatid Mites of the Neotropical Region II', in J. Balogh and S. Mahunka (eds) *The Soil Mites of the World*, Elsevier, Amsterdam.
- Balogh, J. y Balogh, P. (1992) *The Oribatid Mite Genera of the World*, vols 1 and 2, Hungarian Natural History Museum Press, Budapest.
- Balogh, J. y Mahunka, S. (1983) *Primitive Oribatids of the Palaearctic Region*, Elsevier, Amsterdam.
- Caruso, T. y Migliorini, M. (2006) 'Micro-arthropod communities under human disturbance: Is taxonomic aggregation a valuable tool for detecting multivariate change? Evidence from Mediterranean soil oribatid coenoses', *Acta Oecologica*, vol. 30, no 1, pp. 46–53.
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K. y Shen, T.-J. (2005) 'A new statistical approach for assessing compositional similarity based on incidence and abundance data', *Ecology Letters*, vol. 8, no. 2, pp. 148–159.
- Chao, A., Chazdon, R. L., Colwell, R. K. y Shen, T.-J. (2006) 'Abundance-based similarity indices and their estimation when there are unseen species in samples', *Biometrics*, vol. 62, no. 2, pp. 361–371.
- Colwell, R. K. (2006) 'EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from sample; Version 8 User's Guide and Application', <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Crossley, D. y Coleman, D. (1999) 'Microarthropods', in M. E. Sumner (ed) *Handbook of Soil Science*, CRC Press, Boca Raton, pp. 59–65.
- Dindal, D. L. (1990) *Soil Biology Guide*, John Wiley & Sons, New York.
- Franklin, E. y Morais, J. W. (2006) 'Soil Mesofauna in Central Amazon', in F. M. S. Moreira, J. O. Siqueira and L. Brussaard (eds) *Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems*, CABI Publishing, Wallingford, pp. 142–162.
- Greenslade, P., Deharveng, L., Bedos, A. y Suhardjono, Y. R. (2008) *Handbook to Collembola of Indonesia*, Fauna Malesiana, Brill, Leiden (in press).
- Krantz, G. W. (1978) *A Manual of Acarology*, Oregon State University Book Store Inc., Oregon.
- Ludwig, J. A. y Reynolds, J. F. (1988) *Statistical Ecology: A Primer on Methods and Computing*, John Wiley and Sons, New York.
- Minor, M. (2004) 'Soil mites and other animals', www.massey.ac.nz/~maminor/mites.html, accessed 10 January 2008.
- Norton, R. A. (1990) 'Acarina: Oribatida', in D. L. Dindal (ed) *Soil Biology Guide*, John Wiley and Sons, New York, pp. 779–803.

- Ruf, A., Beck, L., Dreher, P., Hund-Rinke, K., Römbke, J. y Spelda, J. (2003) "A biological classification concept for the assessment of soil quality: "Biological soil classification scheme" (BBSK)', *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 98, no. 1-3, pp. 263-271.
- Siepel, H. (1990) 'Niche relationships between two panphytophagous soil mites, *Nothrus silvestris* Nicolet (Acari, Oribatida, Nothridae) and *Platynothrus peltifer* (Koch) (Acari, Oribatida, Camisiidae)', *Biol. Fert. Soils*, vol. 9, no. 2, pp. 139-144.
- Travè, J. (1965) "Quelques techniques de récolte, de triage, d'observation et de conservation des Oribates (Acariens) et autres microarthropodes", *Revue d'Écologie et de Biologie du Sol*, vol. 2, pp. 23-47.
- Yoshii, R. (1981a) 'Paronellid Collembola of Sabah', *Entomological Report from the Sabah Forest Research Centre No. 3*, Japan International Cooperation Agency, EX-1 JR, 81-12, pp. 1-70.
- Yoshii, R. (1981b) 'Neanurid Collembola of Sabah', *Entomological Report from the Sabah Forest Research Centre No. 4*, Japan International Cooperation Agency, EX-1 JR, 81-12, pp. 1-70.
- Yoshii, R. (1982a) 'Lepidocyrtid Collembola of Sabah', *Entomological Report from the Sabah Forest Research Centre No. 5*, Japan International Cooperation Agency, pp1-38.
- Yoshii, R. (1982b) 'Studies on the Collembolan Genera *Callyntrura* and *Dicranocentroides*', *Entomological Report from the Sabah Forest Research Centre No. 6*, Japan International Cooperation Agency, pp. 1-38.
- Yoshii, R. (1983) 'Studies on Paronellid Collembola of East Asia', *Entomological Report from the Sabah Forest Research Centre No. 7*, Japan International Cooperation Agency, pp. 1-28.

CAPÍTULO 5

Nematodos del suelo

Juvenil E. Cares y Shiou P. Huang (†)

INTRODUCCIÓN

Los nematodos del suelo son pequeños invertebrados dependientes del agua, los cuales se consideran uno de los grupos de animales más abundantes y más diversos en el planeta. Debido a su gran capacidad de adaptación, los nematodos están presentes en cualquier lugar donde exista carbono orgánico, en todas las latitudes del planeta y desde fondo del mar hasta la cima de las montañas. La palabra nematodo deriva del griego "*nema*" que significa "forma de un hilo", ya que poseen un cuerpo alargado y cilíndrico. Derivado de su evolución, los nematodos se adaptaron a la exploración de una amplia variedad de fuentes de alimento. De esta manera, los nematodos parásitos tienen la capacidad de colonizar y alimentarse de tejidos de plantas y animales, mientras que las formas de vida libre se alimentan de microorganismos (bacterias y hongos), protozoarios, algas, otros nematodos y microinvertebrados.

Los nematodos en una primera aproximación, son conocidos como una amenaza para la salud humana, animal y de plantas; sin embargo, ellos juegan un papel importante como agentes de ciclado de nutrientes y como reguladores de la fertilidad del suelo mediante el flujo de energía y la movilización y utilización de nutrimentos (Procter, 1990). Aunque la biomasa de nematodos en el suelo es pequeña (10^1 a 10^4 mg peso seco m^{-2}), ellos son responsables del 10 a 15% de la respiración de los animales del suelo (Sohlenius, 1980; Petersen, 1982); además de estos bene-

ficios para el ecosistema, también participan en importantes servicios del agroecosistema al fungir como agentes de control biológico de plagas de insectos; tal es el caso de los nematodos entomofílicos *Deladenus siricidicola* o los entomopatógenos *Steinernema carpocapsae* y *Heterorhabditis bacteriophora*. Su omnipresencia y abundancia en todo tipo de suelos y hábitats acuáticos, así como su ciclo de vida corto y sensibilidad ante alteraciones ambientales, los califican como poderosos bioindicadores de condiciones ecológicas (Huang y Cares, 2006).

Los nematodos del suelo viven en grupos o gremios, compuestos por lo general de cinco grupos funcionales principales: parásitos de plantas, bacteriófagos, micó-fagos, depredadores y omnívoros (Ilustración 2). Por tal motivo, los nematodos están bien representados a lo largo de la red trófica del suelo. Aunque la identificación de estos organismos requiere de intenso entrenamiento, en la mayoría de los casos la identificación de los diferentes grupos funcionales puede lograrse en base a la morfología de su aparato bucal. En el caso de nematodos parásitos de plantas, el aparato bucal incluye un estilete tipo aguja (Ilustración 2a), mediante el cual puede causar pérdidas significativas en varios cultivos. Los micó-fagos, equipados en su mayoría con un estilete pequeño y delicado (Ilustración 2b), se alimentan de las hifas de hongos saprofitos, patogénicos, benéficos y micorrízicos; algunos nematodos micó-fagos son pueden comportarse como parásitos facultativos de plantas. Los nematodos bacteriófagos, mismos que carecen de estilete (Ilustración 2c), pueden regular el nitrógeno y el fósforo disponible para las plantas, influir en la nodulación por parte de bacterias tipo *Rhizobium*, así como alimentarse y diseminar bacterias benéficas y fitopatógenas. Como típicos estrategas r, los nematodos bacteriófagos pueden incrementar su población ante cualquier perturbación del suelo o bien, bajo condiciones de enriquecimiento de nutrientes, una condición que puede interpretarse como indicador de la fertilidad del suelo (Ferris *et al.* 2001). Los nematodos depredadores tienen la cavidad bucal equipada con una o más estructuras en forma de dientes (Ilustración 2d), o en algunos casos, poseen un estilete que les permite alimentarse de otros nematodos, microinvertebrados y protozoarios; en algunos casos, pueden alimentarse de bacterias y esporas de hongos. Los omnívoros tienen la cavidad bucal armada con un estilete hueco (Ilustración 2e); son polí-fagos, con la capacidad de alimentarse de cualquier fuente, por lo que pueden fungir como micó-fagos, bacteriófagos, herbívoros y también como depredadores al alimentarse de otros nematodos.

Algunos nematodos viven en un amplio rango de ambientes, mientras otros ocupan áreas más restringidas. Se distinguen también entre ellos mismos por su

sensibilidad a la perturbación del suelo y a los contaminantes químicos. Según lo propuesto por Bongers (1990) y Bongers y Borgers (1998), los nematodos colonizadores (similares a los estrategas r) típicamente poseen un tiempo de generación corto, producen muchos huevecillos pequeños, muestran la presencia de dauerlarva e incrementan sus poblaciones cuando existen condiciones ricas en alimentación, además son los más resistentes a la perturbación del suelo y a contaminantes químicos. Por otra parte, los nematodos persistentes (similares a estrategas k) se caracterizan por necesitar un largo tiempo de generación, producen pocos huevecillos, pero más grandes; poseen una baja movilidad, una ausencia de dauerlarva y sensibilidad ante contaminantes y otros factores de perturbación; por tal motivo, un análisis apropiado de la comunidad de nematodos, tomando en cuenta su diversidad, abundancia y estructura de comunidad, puede presentar un índice de sistemas de uso de suelo y cambios de uso de suelo y medir los niveles de perturbación provocados por contaminantes y otros factores.

MUESTREO DE SUELO

En cada punto de muestreo dentro de un sistema de cuadrícula (véase Capítulo 2), se trazan dos círculos concéntricos, con un radio de 3 m y 6 m, respectivamente. Para colectar el suelo se utiliza un nucleador de acero y las muestras se toman en cuatro puntos equidistantes en el círculo pequeño, y ocho puntos en el círculo grande; todos los núcleos de suelo se deben tomar a una profundidad de 20 cm. Los doce núcleos de suelo se depositan en una bolsa de plástico que deberá sellarse para evitar su desecación y además protegerla de la luz solar. Las muestras son transportadas al laboratorio en una caja aislada y almacenadas a 4° C hasta su extracción, lo cual deberá hacerse con la mayor rapidez posible.

EXTRACCIÓN DE NEMATODOS

La muestra de suelo se mezcla completamente y se toma una submuestra de 300 ml, la cual se vacía a una cubeta con 2 litros de agua; se agita durante 30 segundos y se deja reposar otros 2 minutos para que las partículas del suelo se sedimenten. Esta suspensión se pasa a través de tamices de 40 a 60 mallas (tamaño de malla de 250 a 350 μm , respectivamente), y los nematodos se colectan directamente en un tamiz de 400 mallas (tamaño de malla de 37 μm) (Figura 5.1). A esta última suspensión de nematodos se le pueden eliminar aún más partículas de

suelo mediante un método modificado de centrifugación con flotación de azúcar (Jenkins, 1964). En este procedimiento, la suspensión acuosa se centrifuga primero a 3,500 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se descarta. Posteriormente, el sedimento o botón dentro del tubo de centrifuga se resuspenden en solución de sacarosa (456g L^{-1}) (Figura 5.2a) y se centrifuga de nuevo a 1,000 rpm durante uno a dos minutos; los nematodos se colectan a partir del sobrenadante utilizando un cernidor con tamaño de malla de $37\ \mu\text{m}$ (Figura 5.2b). Los especímenes que se hallan sobre la malla se lavan y arrastran con agua, para luego colectarse en un vaso de precipitados (Figura 5.3a). La suspensión, contenida en el vaso, se distribuye en tubos de ensayo para su fijación.

FIJACIÓN Y CONTEO DE NEMATODOS

Los nematodos extraídos se matan con agua caliente a $50\text{-}60^\circ\text{C}$ durante un máximo de un minuto (Figura 5.3b) y, posteriormente se fijan con solución Golden ZX (Hooper, 1970). Una vez calentados los tubos, éstos se dejan reposar durante 30 minutos y se remueve el exceso de sobrenadante utilizando una pipeta o por medio de succión al vacío (preferentemente), dejando así una suspensión de nematodos de 10 a 20 ml. Posteriormente, se añade un volumen igual de solución Golden

Figura 5.1 A la izquierda, juego de tamices de metal (de tamaño de malla 45 arriba y 400 abajo), y a la derecha, suspensión de suelo en reposo.



Figura 5.2 a) Adición de solución de sacarosa para resuspender la mezcla de suelo y nematodos, depositada en el fondo del tubo de centrifuga b) tamizado de la suspensión de nematodos después de la flotación con sacarosa.

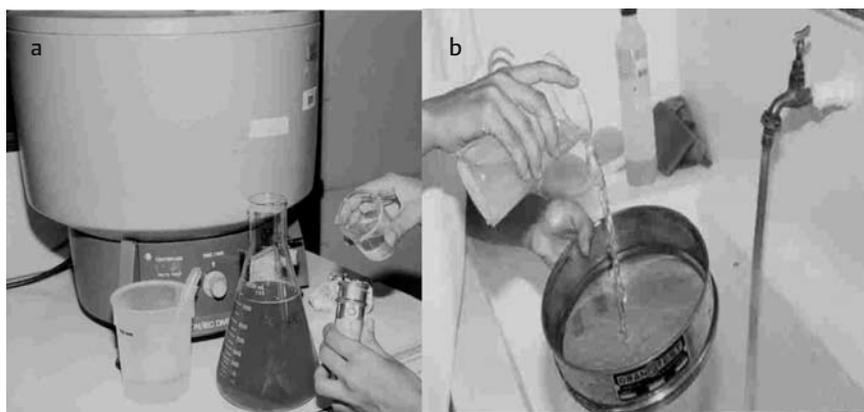
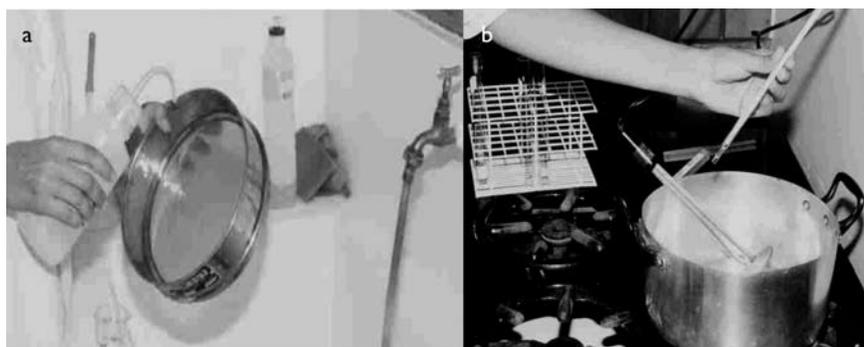


Figura 5.3 a) Nematodos recuperados mediante el lavado de malla de 400; b) muerte de nematodos en agua caliente. La rejilla que contiene a los tubos se sumerge en un recipiente con agua.



2X, con lo que se obtiene una concentración final de formol 3.2%. La suspensión resultante se ajusta a un volumen de 15 ml y se cuenta el total de nematodos en la población mediante la toma al azar, de alícuotas de 1 ml; el número total se obtiene de multiplicar la media de tres conteos de manera que el número total representará el número medio de 3 conteos de submuestras x 15.

INFILTRACIÓN CON GLICERINA Y OBSERVACIÓN DE NEMATODOS

El método de Seinhorst (Seinhorst, 1959) suele modificarse para evitar la laboriosa tarea de pescar individualmente cada nematodo y elaborar numerosas preparaciones permanentes. La modificación consiste en reducir a 3 ml el volumen de la suspensión (Figura 5.4), luego se añaden 7 ml de la solución Seinhorst I (Figura 5.5, Tabla 5.1) y el volumen resultante se vacía por completo en una caja Petri de 5 cm de diámetro; la caja se coloca en un desecador a 43°C durante la noche (Figura 5.6). Al segundo día, la caja se retira del desecador y se deja evaporar a la misma temperatura durante un mínimo de cuatro horas; en esas condiciones se retira la tapa de la caja para que se reduzca por lo menos a la mitad de su volumen. El volumen de la caja se reestablece con solución Seinhorst II, se tapa la caja y se deja nuevamente en el desecador durante la noche. Estos pasos se repiten tres veces, aunque en la última ocasión no es necesario añadir solución Seinhorst II pero sí incubar a la misma temperatura durante otras 48 horas para evaporar todo el alcohol. El procedimiento se ilustra en la Figura 5.5, mientras que la composición de las soluciones se puede observar en la Tabla 5.1.

Después de este proceso, los nematodos de la caja se montan en laminillas, utilizando una gota de glicerina deshidratada como medio de montaje. Antes de colocar el cubreobjetos de vidrio sobre la gota, se coloca una tira de cinta adhesiva para evitar que el cubreobjetos aplaste a los especímenes; al final, la preparación se sella utilizando bálsamo de Canadá (Huang *et al.*, 1984) (Figura 5.7). Se hace una selección al azar de aproximadamente 100 nematodos montados para su identificación a nivel de género, utilizando un microscopio compuesto (se requiere un aumento de 400 a 1,000 x). La identificación de nematodos por caracteres morfológicos se basa en la literatura taxonómica especializada (Goodey, 1951; Thorne, 1961; Goseco *et al.* 1974; Andrassy, 1983; Bongers, 1988, 1994; Smart Jr y Nguyen, 1988; Anderson y Potter, 1991; Baldwin y Mundo-Ocampo, 1991; Decraemer, 1991; Fortuner, 1991; Geraert, 1991; Loof, 1991; Maggenti, 1991; Nickle y Hooper, 1991; Raski, 1991; Smart Jr y Nguyen, 1991; Jairajpuri y Ahmad, 1992; Hunt, 1993; May *et al.*, 1996; Cares y Huang, 2000, 2001).

Figura 5.4 Remoción del exceso de agua sin perturbar el fondo de la suspensión de nematodos

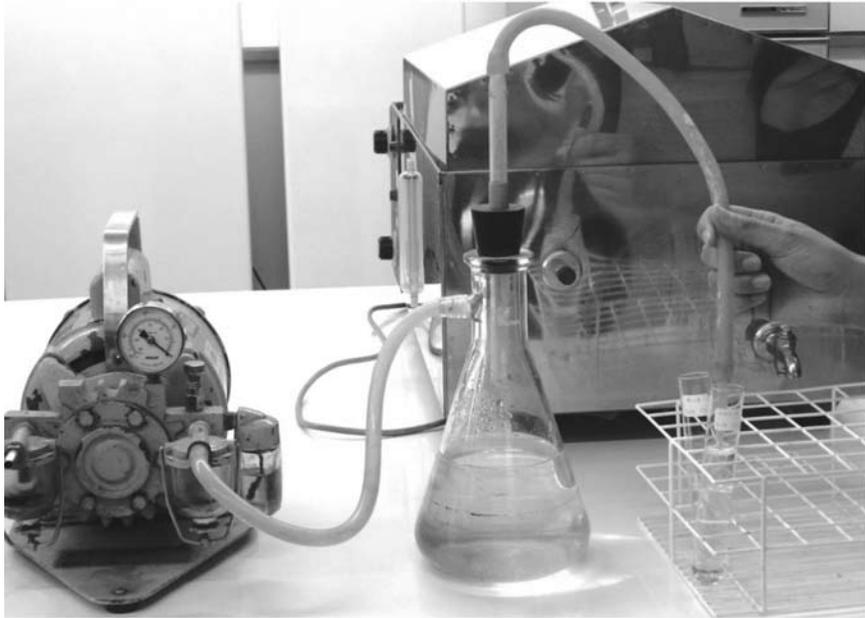


Figura 5.5 Esquema del método de Seinhorst modificado (proceso de infiltración en glicerina) para una muestra masiva de nematodos. Las cajas Petri no deben contener más de una tercera parte de líquido.

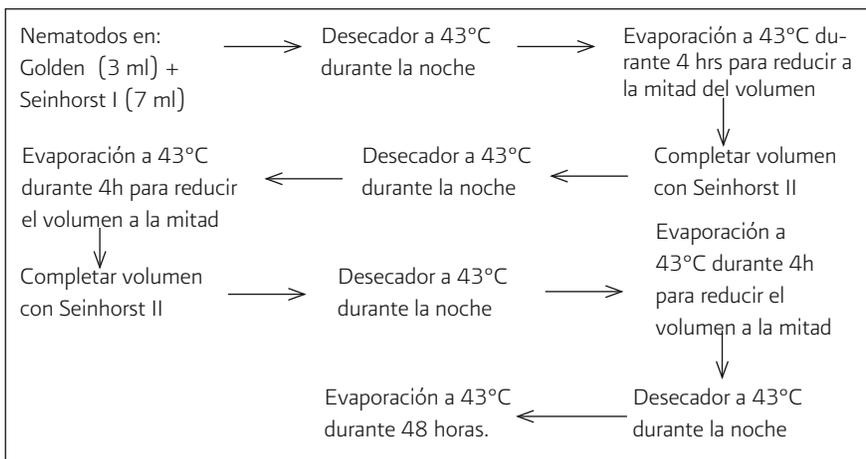


Figura 5.6 Cámara de desecación con cajas Petri que contienen nematodos para infiltración en glicerina.



Nota: el fondo del contenedor se mantiene a 43°C.

Foto: Marcella A. Teixeira.

Figura 5.7 Charola con montajes permanentes de especímenes de nematodos. Foto Francisco Franco.



TABLA 5.1 COMPOSICIÓN DE REACTIVOS UTILIZADOS EN LA FIJACIÓN DE NEMATODOS E INFILTRACIÓN EN GLICERINA.

	<i>Golden X</i>	<i>Golden ZX</i>
Formol		
(+ 40% formaldehído)	8 partes	16 partes
Glicerina	2 partes	4 partes
Agua destilada	90 partes	80 partes
	<i>Seinhorst I</i>	<i>Seinhorst II</i>
Alcohol 96%	20 partes	95 partes
Glicerina	2 partes	5 partes
Agua destilada	78 partes	

ÍNDICES Y PARÁMETROS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE POBLACIONES DE NEMATODOS

Los nematodos identificados a nivel de género pueden dividirse en cinco grupos tróficos: parásitos de plantas, micófagos, bacteriófagos, depredadores y omnívoros, todos ellos basados en los criterios de Yeates *et al.* (1993). Los datos sobre frecuencia absoluta, abundancia total y abundancia relativa de cada uno de los géneros, pueden utilizarse para calcular índices de diversidad y equitatividad, empleando las fórmulas que se mencionan líneas adelante. Los datos de frecuencia y abundancia de los diferentes grupos tróficos se usan para calcular el Índice de Diversidad Trófica y varios cocientes que consideran la abundancia relativa de los grupos tróficos; cuando un nematodo tiene dos tipos de hábitos alimenticios. Si un nematodo posee dos tipos de hábito alimenticio, su número poblacional se divide entre dos para cada hábito.

Índice de Riqueza de Género [$d = (S - 1) / \log N$,

donde S = número de géneros y N = número total de nematodos].

Índice de Diversidad de Simpson [$D_s = 1 - \sum(p_i)^2$,

donde p_i = porcentaje de género "i" en la abundancia total].

Índice de Diversidad de Shannon [$H' = - \sum p_i \log_2 p_i$].

Equitatividad del Índice de Diversidad de Simpson [$E_s = D_s / D_{s_{\max}}$, donde $D_{s_{\max}} = 1 - 1/S$

Equitatividad del Índice de Diversidad de Shannon [$J' = H' / H'_{\max}$, donde $H'_{\max} = \log_2 S$].

Índice de Diversidad Trófica $[T = 1 / \sum(p_i)^2]$,

donde p_i = abundancia relativa de un grupo trófico ; véase Norton, 1978; Magurran, 1988; Krebs, 1994].

La relación micófagos/bacteriófagos (M/B) y (micófagos+bacteriófagos)/parásitos de plantas [(M+B)/PP].

Porcentajes de criconematidos y de dorylaimidos en la población.

Bongers (1990) dividió a los nematodos del suelo en una serie desde los colonizadores (c) hasta los persistentes (p) (similar a los estrategas r y k, respectivamente), asignándoles un "valor cp" en una escala de 1 a 5. Los colonizadores cp1 se caracterizan por tener tiempos generacionales cortos, producen muchos huevecillos pequeños, siempre están activos, presentan *dauerlarvae* o estadios de sobrevivencia y crecen bajo condiciones de riqueza de alimento. Por el contrario, los persistentes cp5 se distinguen por tiempos generacionales largos, la producción de pocos huevecillos pero muy grandes, baja movilidad, ausencia de *dauerlarvae* y elevada sensibilidad ante la presencia de contaminantes y otros factores de perturbación (Bongers y Bongers, 1998). En base a estos conceptos, se han utilizado varios índices para la evaluación del suelo; el Índice de Madurez (IM) (que incluye únicamente nematodos de vida libre) (Tabla 5.2) y el Índice Fitoparasítico (IFP) (que incluye únicamente parásitos de plantas) (Tabla 5.3). Para medir el nivel de perturbación del suelo (Bongers, 1990), $\sum(v_i \times f_i)$ (donde v_i = valor c-p de 1 a 5 para el género 'i', y f_i = frecuencia relativa del género 'i'). Yeates (1994) amplió el Índice de Madurez para incluir a todos los nematodos del suelo (mIM). Bongers y Bongers (1998) propusieron IM_{2-5} (igual que IM, pero excluyendo a los nematodos cp1) para evaluar factores de estrés inducidos por contaminación, y el cociente IFP /IM como un indicador de fertilidad del suelo.

TABLA 5.2 FAMILIAS Y VALORES CP UTILIZADOS PARA EL ÍNDICE DE MADUREZ*

Familia	valor cp	Familia	valor cp
Neotylenchidae	2	Achromadoridae	3
Anguinidae	2	Ethmolaimidae	3
Aphelenchidae	2	Cyatholaimidae	3
Aphelenchoididae	2	Desmodoridae	3
Rhabditidae	1	Microlaimidae	3

TABLA 5.2 FAMILIAS Y VALORES CP UTILIZADOS PARA EL ÍNDICE DE MADUREZ*

Familia	valor cp	Familia	valor cp
Alloionematidae	1	Odontolaimidae	3
Diploscapteridae	1	Aulolaimidae	3
Bunonematidae	1	Bastianiidae	3
Cephalobidae	2	Prismatolaimidae	3
Ostellidae	2	Ironidae	4
Panagrolaimidae	1	Tobrilidae	3
Myolaimidae	2	Onchulidae	3
Teratocephalidae	2	Tripylidae	3
Diplogasteridae	1	Alaimidae	4
Neodiplogasteridae	1	Bathyodontidae	4
Diplogasteroididae	1	Mononchidae	4
Tylopharyngidae	1	Anatonchidae	4
Odontopharyngidae	1	Nygolaimidae	5
Monhysteridae	1	Dorylaimidae	4
Xyalidae	2	Chrysonematidae	5
Linhomoeidae	3	Thornenematidae	5
Plectidae	2	Nordiidae	4
Leptolaimidae	3	Qudsianematidae	4
Halaphanolaimidae	3	Aporcelaimidae	5
Diplopeltidae	3	Belondiridae	5
Rhabdolaimidae	3	Actinolaimidae	5
Chromadoridae	3	Discolaimidae	5
Hypodontolaimidae	3	Leptonchidae	4
Choanolaimidae	4	Diphtherophoridae	3

Nota: *Bongers (1990).

TABLA 5.3 FAMILIAS Y VALORES CP UTILIZADOS PARA EL ÍNDICE FITOPARASÍTICO

cp2	cp3	cp4	cp5
Tylenchidae	Dolichodoridae	Trichodoridae	Longidoridae
Psilenchidae	Hoplolaimidae		
Tyloporidae	Pratylenchidae		

Nota:*modificado de Bongers (1990).

Tabla 5.3 CONTINÚA

cp2	cp3	cp4	cp5
Ecphyadophoridae	Heteroderidae		
Paratylenchidae	Hemicycliophoridae		
Anguinidae			

Nota: * modificado de Bongers (1990).

REFERENCIAS

- Anderson, R. V. y Potter, J. W. (1991) 'Stunt nematodes: *Tylenchorhynchus*, *Merlinius*, and related genera', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcell Dekker, New York, pp. 529–586.
- Andrássy, I. (1983) *A taxonomic review of the suborder Rhabditina (Nematoda Secernentia)*, Eötvös Lorand University, Budapest.
- Baldwin, J. G. y Mundo-Ocampo, M. (1991) 'Heteroderinae cyst- and non-cyst-forming nematodes', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcel Dekker, New York, pp. 275–362.
- Bongers, T. (1988) *De Nematoden van Nederland*, Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, Bibliotheekuitgave no 46, Pirola, Schoorl, The Netherlands.
- Bongers, T. (1990) 'The maturity index: An ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition', *Oecologia*, vol. 83, pp. 14–19.
- Bongers, T. (1994) *De Nematoden van Nederland*, 2nd edition, Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, Bibliotheekuitgave no. 46, Pirola, Schoorl, The Netherlands.
- Bongers, T. y Bongers, M. (1998) 'Functional diversity of nematodes', *Applied Soil Ecology*, vol. 10, no. 3, pp. 239–251.
- Cares, J. E. y Huang, S. P. (2000) "Taxonomia atual de fitonematóides, Chave sistemática simplificada para gêneros Parte I", *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, vol. 8, pp. 185–223.
- Cares, J. E. y Huang, S. P. (2001) "Taxonomia de fitonematóides; Chave sistemática simplificada para gêneros Parte II", *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, vol. 9, pp. 177–235.
- Cares, J. E. y Huang, S. P. (2006) 'Nematode communities in soils under different land-use systems in Brazilian amazon and savanna vegetation', in F. M. Moreira, J. O. Siqueiera and Brussaard, L. (eds) (2006) *Soil Biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems*, CABI Publishing, London, pp. 163–183.

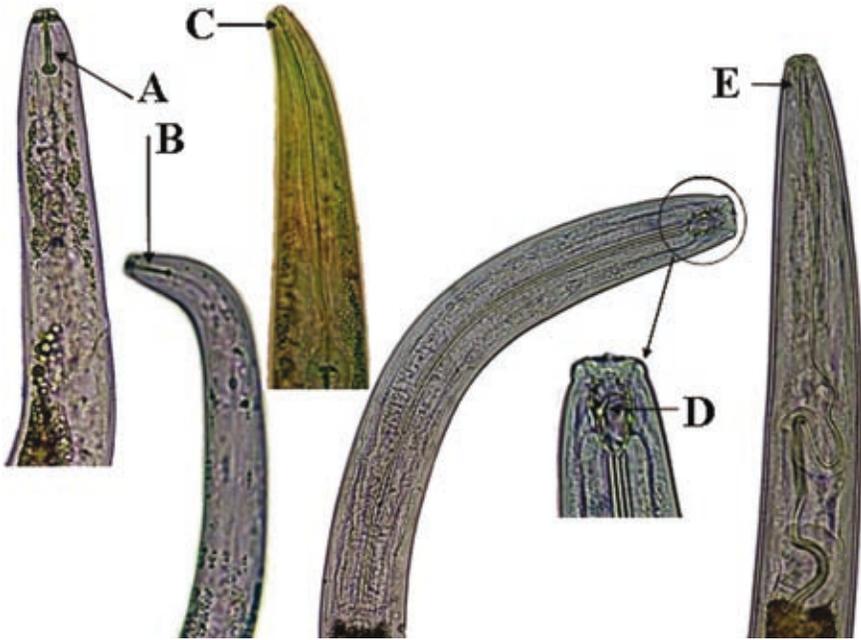
- Decraemer, W. (1991) 'Stubby root and virus vector nematodes: *Trichodorus*, *Paratrichodorus*, *Allotrichodorus*, and *Monotrichodorus*', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcel Dekker, New York, pp. 587–626.
- Ferris, H., Bongers, T. y Goede, R. G. M. (2001) 'A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept', *Applied Soil Ecology*, vol. 18, no 1, pp. 13–29.
- Fortuner, R. (1991) 'The Hoplolaimidae', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcel Dekker, New York, pp. 669–720.
- Geraert, E. (1991) 'Tylenchidae in agricultural soils', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcel Dekker, New York, pp. 795–826.
- Goodey, T. (1951) *Soil and freshwater nematodes*, Methuen and Co. Ltd., London.
- Goseco, C. G., Ferris, V. R. y Ferris, J. M. (1974) *Revision in Leptonchoidea* (Nematoda: Dorylaimida), Purdue Nematode Collection Department of Entomology, Purdue University, West Lafayette, Indiana.
- Hooper, D. F. (1970) 'Handling, fixing, staining and mounting nematodes', in J. F. Southey (ed) *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin No 2, pp. 34–39.
- Huang, S. P. y Cares, J. E. (2006) 'Nematode communities in soils under different land-use systems in Brazilian Amazon and savanna vegetation', in F. M. Moreira, J. O. Siqueira and L. Brussaard (eds) *Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems*, 1st edition, CAB International, Wallingford, pp. 163–183.
- Huang, C. S. Bittencourt, C. y Silva, E. F. S. M. (1984) 'Preparing nematode permanent mounts with adhesive tapes', *Journal of Nematology*, vol. 16, no 3, pp. 341–342.
- Hunt, D. J. (1993) *Aphelenchida, Longidoridae, and Trichodoridae: Their systematics and bionomics*, CAB International, Wallingford.
- Jairajpuri, M. S. and Ahmad, W. (1992) *Dorylaimida: Free-living, Predaceous and Plant Parasitic Nematodes*, E. J. Brill, Leiden.
- Jenkins, W. R. (1964) 'A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil', *Plant Disease Reporter*, vol. 48, no 9, pp. 662–665.
- Krebs, C. J. (1994) *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*, 4th edition, Harper Collins College Publishers, New York.
- Loof, P. A. (1991) 'The family Pratylenchidae Thorne, 1949', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcel Dekker, New York, pp. 363–422.
- Maggenti, A. R. (1991) 'Nemata: Higher classification', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcell Dekker, New York, pp. 147–190.

- Magurran, A. E. (1988) *Ecological Diversity and its Measurement*, Cambridge University Press, Cambridge.
- May, W. F., Mullin, P. G., Lyon, H. H. y Loeffler, K. (1996) *Pictorial Key to Genera of Plant Parasitic Nematodes*, 5th edition, Cornell University Press, New York.
- Nickle, W. R. y Hooper, D. J. (1991) 'The Aphelenchina: Bud, leaf, and insect nematodes', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcel Dekker, New York, pp. 465–508.
- Norton, D. C. (1978) *Ecology of Plant Parasitic Nematodes*, John Wiley and Sons, New York
- Petersen, H. (1982) 'Structure and size of soil animal populations', *Oikos*, vol. 39, no. 3, pp. 306–329.
- Procter, D. L. C. (1990) 'Global overview of the functional roles of soil-living nematodes in terrestrial communities and ecosystem', *Journal of Nematology*, vol. 22, no. 1, pp. 1–7.
- Raski, D. J. (1991) 'Tylenchulidae in agricultural soils', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcel Dekker, New York, pp. 761–794.
- Seinhorst, J. W. (1959) 'A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin', *Nematologica*, vol. 4, pp. 67–69.
- Smart Jr, G. C. and Nguyen, K. B. (1988) *Illustrated Key for Identification of Common Nematodes in Florida*, University of Florida, Gainesville.
- Smart Jr, G. C. y Nguyen, K. B. (1991) 'Sting and awl nematodes: *Belonolaimus* spp. and *Dolichodorus* spp.', in W. R. Nickle (ed) *Manual of Agricultural Nematology*, Marcell Dekker, New York, pp. 627–668.
- Sohlenius, B. (1980) 'Abundance, biomass and contribution to energy flow by soil nematodes in terrestrial ecosystems', *Oikos*, vol. 34, no. 2, pp. 186–194.
- Thorne, G. (1961) *Principles of Nematology*, McGraw Hill Co., New York.
- Yeates, G. W. (1994) 'Modification and quantification of the nematode maturity index', *Pedobiologia*, vol. 38, pp. 97–101.
- Yeates, G. W., Bongers, T., de Goede, R. G. M., Freckman, D. W. y Georgieva, S. S. (1993) 'Feeding habits in soil nematode families and genera - an outline for soil ecologists', *Journal of Nematology*, vol. 25, pp. 315–331.

Ilustración 1. Sistema de extracción de hormigas y escarabajos con trampas Winkler a) Delimitación de un metro cuadrado de hojarasca por un marco; b) Colecta de la hojarasca utilizando guantes de cuero, desde el borde hacia el centro; c) Introducción de la hojarasca en un tamiz para separar los fragmentos más gruesos; d) Transferencia del material tamizado a bolsas de nylon en campo; e) Cada muestra de hojarasca tamizada se transfiere a una red; f y g) Se fijan las redes al interior de la trampa Winkler previamente colgadas en un espacio bien aireado con un frasco colocado en el fondo, que contiene alcohol al 70%.



Ilustración 2. Fotomicrografías de la región anterior en las que se muestra el aparato bucal (flechas) de nematodos de suelo pertenecientes a diferentes grupos funcionales: A) parásito de plantas; B) micófago; C) bacteriófago; D) depredador; E) omnívoro. Fotos: Juvenil Cares.



A y B: Estoma con estilete

C: Estoma sin estilete

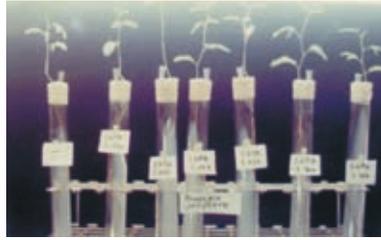
D: Diente dorsal

E: Odonto estilete

Ilustración 3. Pasos de la metodología para caracterizar a las bacterias fijadoras de nitrógeno y formadoras de nódulos en leguminosas (BFNFNL) aplicada en el proyecto CSM-BGBD. Fotos: F. Moreira excepto e) de Lima *et al.*, PAB vol 319, 2009.



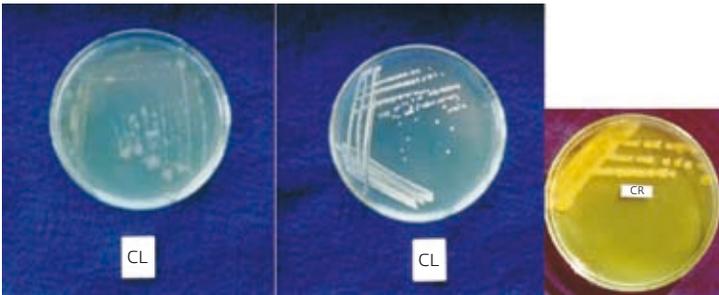
a) Siratro en bolsa de plástico con solución de nutrientes



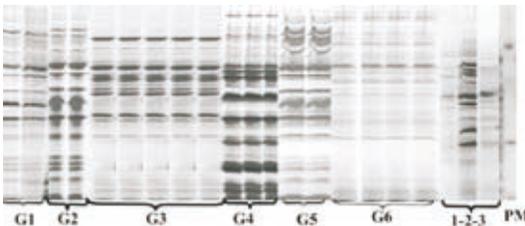
b) Plantas de *Prosopis juliflora* en agar inclinado con solución de nutrientes.



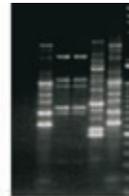
c) Pruebas en plantas de *Phesolus vulgaris* para ver la eficiencia de aislamientos en Jarras de Leonard.



d) Características de dos aislamientos de *Bradyrhizobium* (CL de crecimiento lento) y de *R. tropici* (CR crecimiento rápido) creciendo en YMA



e) Perfiles de proteínas totales obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida.



f) Perfiles de Rep-PCR de diferentes cepas.

Ilustración 4. Esporas y estructuras producidas por especies de hongos micorrizógenos arbusculares de la familia Gigasporaceae: a) espora de *Gigaspora albida* mostrando la célula suspensora bulbosa (flecha), típica de la familia; b) espora de *Scutellospora scutata* con la célula suspensora bulbosa (flecha); obsérvese el escudo redondo de germinación de color café que contrasta con el color hialino de la espora; c) detalle de la ornamentación de la pared de la espora (verrugas) de *Scutellospora coralloidea*; d) células auxiliares nudosas diferencias por miembros del género *Scutellospora*. Esporas y estructuras producidas por especies de HMA de la familia Acaulosporaceae: e) espora de *Entrophospora colombiana* mostrando la pared de la espora, pared germinal 1 (gw1) y pared germinal 2 (gw2) con su capa más interna en reacción con el reactivo Melzer; f) espora de *Entrophospora colombiana* mostrando las dos cicatrices (flecha); g) espora de *Acaulospora scrobiculata* mostrando la cicatriz (flecha) que queda en la espora después de que se suelta el sáculo esporífero; h) esporas de *Acaulospora* sp. mostrando algunos sáculos esporíferos todavía fijados a la espora (flecha). Fotos: Sidney Stümer.

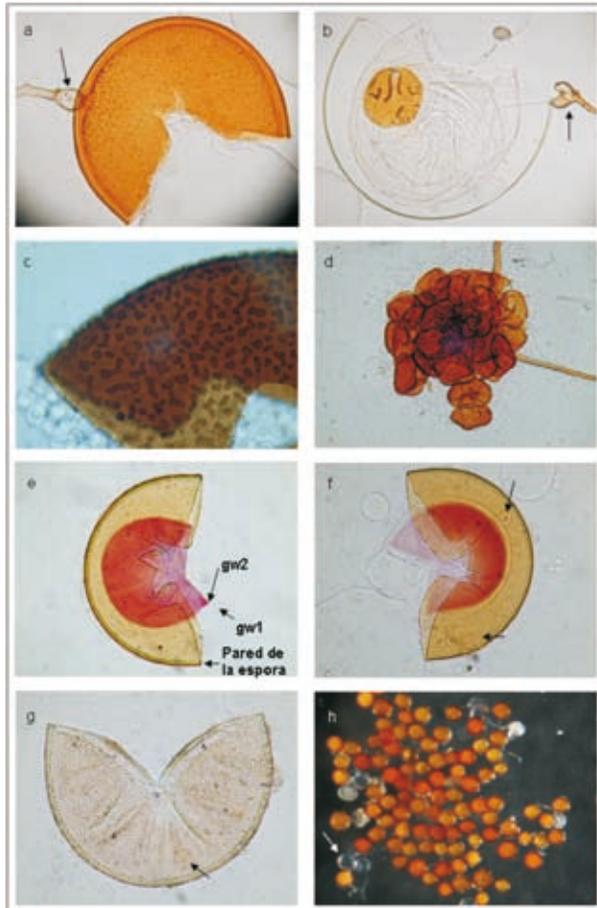


Ilustración 5. Esporas y estructuras producidas por especies de HMA de la familia Glomeraceae: a) Espora de *Glomus clarum* mostrando la hifa de sostén; obsérvese que la capa más profunda de la pared de la espora se separa y se asemeja a la pared germinal; b) Espora de *Glomus* sp. mostrando la pared de la hifa de sostén de manera continua con la pared de la espora; c) Esporocarpio de *Glomus clavispora*; d) Esporocarpio de *Glomus* sp. Esporas y estructuras producidas por especies de HMA de la familia Archaeosporaceae (e y f) y Paraglomeraceae (g y h): e) espora de *Archaeospora Leptoticha* con sáculo esporífero; f) Detalle de *Archaeospora Leptoticha* mostrando salientes y depresiones en las capas 2 y 3 de la pared de la espora (flecha); g) Espora de *Paraglomus occultum* mostrando la estructura de la pared de la espora formada por tres capas (L1, L2 y L3); h) Espora de *Paraglomus brasilianum* mostrando la estructura de la pared de la espora formada por tres capas (L1, L2 y L3) (obsérvese que la capa L2 está ornamentada con pequeñas crestas). Fotos: Sidney Stümer, excepto de *Paraglomus occultum* y *P. brasilianum* que fueron tomadas de <http://invam.caf.wvu.edu>.

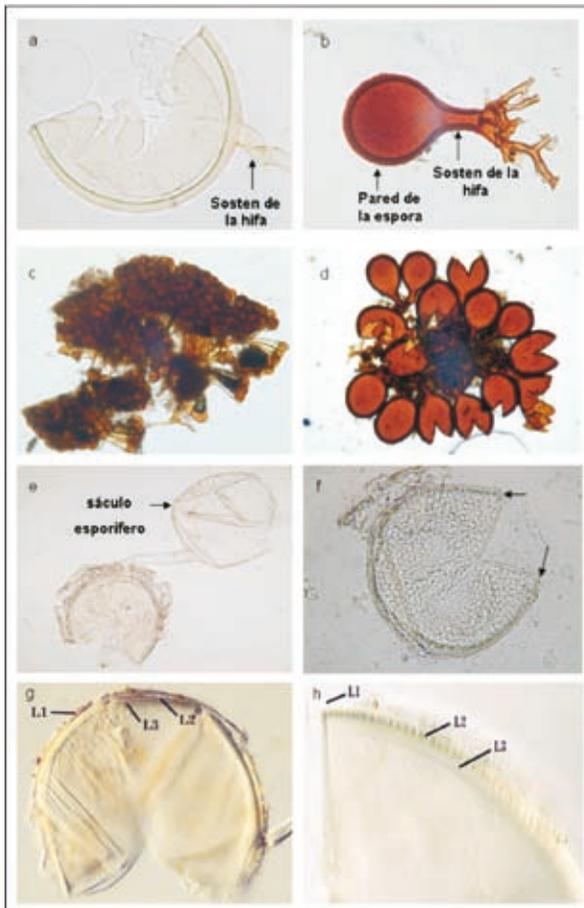


Ilustración 6. Aislamientos de hongos zoospóricos de muestras del ambiente (Oomycota y Chytridiomycota): a) muestra de suelo con cebo; b) muestra de agua con cebo; c) cultivo puro en cebo; d) esporangio de *Phytophthora*; e) Oogonio y anteridio de *Pythium*; f) *Pythium* liberando zoosporas.

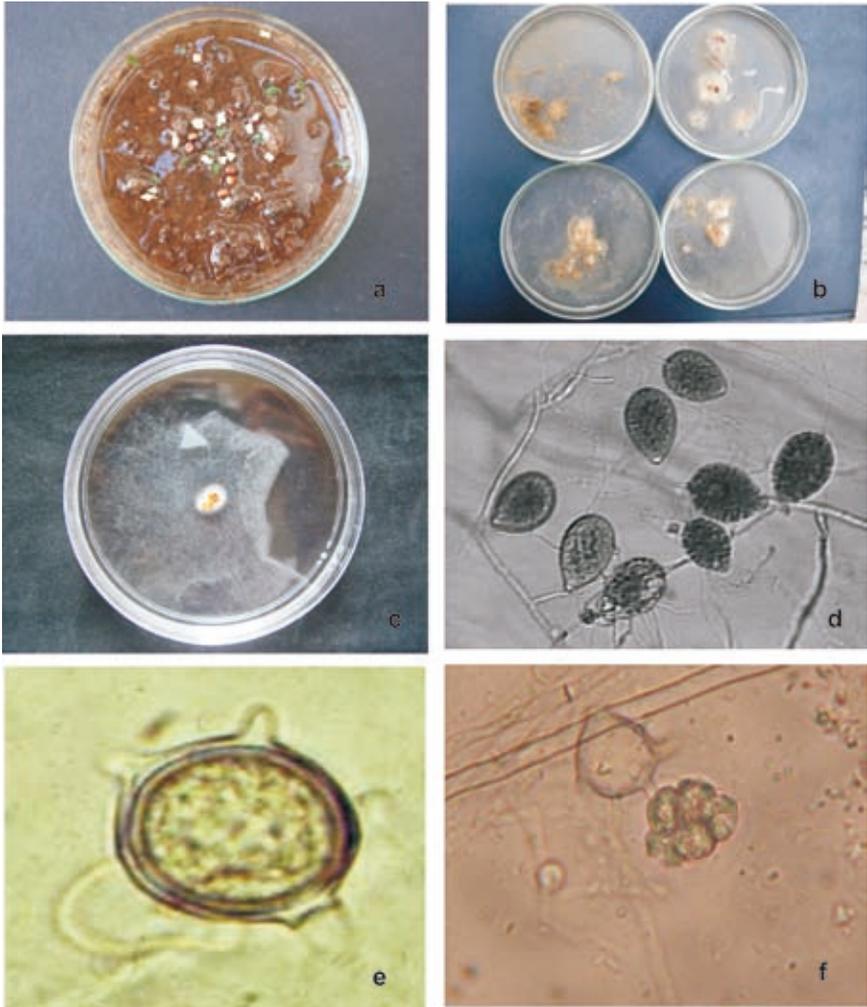
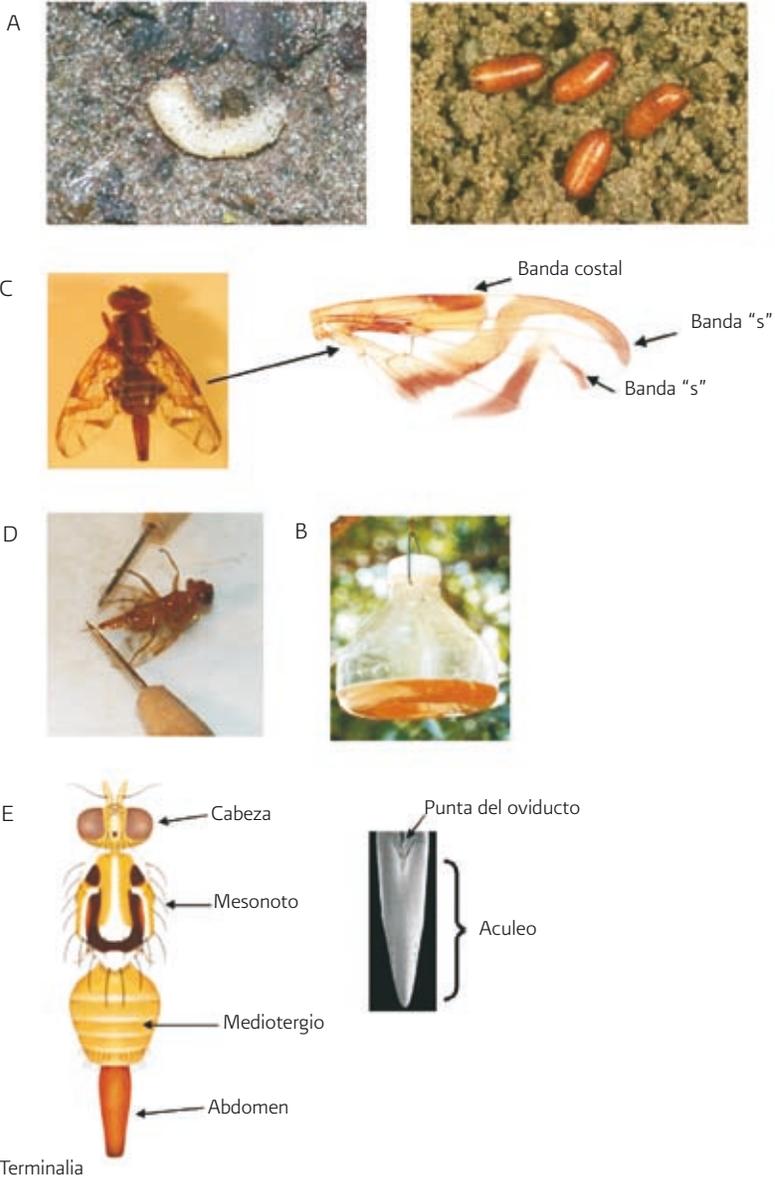


Ilustración 7. Técnica de lavado del suelo para el aislamiento de microhongos del suelo: a) Pre-lavado; b) tamices con diferentes mallas; c) suelo pre-lavado; d) continuando con el procedimiento de lavado; e) partículas de suelo lavado; f) medio de cultivo en placas; g) placa con partículas de suelo para su incubación; h) colonias de hongos en medio de cultivo para retardar el crecimiento. Fotos: Lucas M. Abreu.



Ilustración 8. A) Larvas y pupas de la mosca de la fruta en el suelo; B) Trampa MacPhail con cebo; C) Patrones alares típicos con bandas; D) Extracción del aculeo; E) Adulto de mosca de la fruta y detalle del aculeo.



CAPÍTULO 6

Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas

Fátima M. S. Moreira

LA IMPORTANCIA ECONÓMICA Y ECOLÓGICA DE LA SIMBIOSIS DE BACTERIAS FORMADORAS DE NÓDULOS EN LEGUMINOSAS (BFNFNL)

La fijación biológica de nitrógeno es uno de los procesos más importantes para mantener la vida en el planeta, pues proporciona alrededor del 70% de todo el nitrógeno requerido en los ecosistemas naturales y agroecosistemas (Burns y Hardy, 1975), manteniendo así la armonía con el medio ambiente. La inoculación con cepas de BFNFNL altamente eficientes y adaptadas a las condiciones ambientales dominantes, se utiliza en algunos países con un pequeño y selecto grupo de leguminosas con el propósito de reemplazar el uso de fertilizantes químicos de nitrógeno. En Brasil, la inoculación con cepas de *Bradyrhizobium* reemplaza completamente la aplicación de fertilizantes sintéticos, en el caso de la soya. En el año 2006, considerando un área de 21 millones de hectáreas, donde se cosecharon cerca de 57 millones de toneladas de soya, se ahorraron alrededor de US\$ 3.3 billones de gastos en fertilizantes mediante la aplicación de esta biotecnología. Las cepas, usadas para la inoculación, provienen de una diversidad que se encuentra en el suelo; al mismo tiempo, la biodiversidad del suelo puede afectar el comportamiento de la formación de nódulos de manera positiva o negativa, debido a las múltiples interacciones que se dan entre organismos del suelo y plantas, por lo tanto, un conocimiento de la diversidad de BFNFNL en el suelo deberá ser el primer paso para el manejo y la conservación de este recurso genético de tanto valor.

TAXONOMÍA ACTUAL DE BFNFL

Las bacterias fijadoras de nitrógeno, conocidas anteriormente como rizobios, forman nódulos en las raíces (y algunas veces en los tallos) de algunas especies de leguminosas y en las raíces de *Parasponia* spp. (Ulmaceae). El término rhizobia se deriva de Rhizobiaceae (Conn, 1938), una taxa a nivel familia de bacterias creada expresamente para acomodar organismos que pueden formar nódulos en leguminosas. Una extensión reciente de conocimientos acerca de las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas fue el descubrimiento que estableció que las bacterias pertenecientes al β -proteobacteria (género *Burkholderia* y *Ralstonia/Cupriavidus*) y a otras familias de la α -proteobacteria (por ejemplo, *Methylobacterium* Methylobacteriaceae y *Dovosia* *Hyphomicrobiaceae*) también pueden formar nódulos en leguminosas (Moulin *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Sy *et al.*, 2001; Jourand *et al.*, 2004 Rivas *et al.*, 2002, 2003) (Tabla 6.1); por esta razón, el nombre "rhizobia" ya no resulta idóneo para describir bacterias formadoras de nódulos, aunque se continúa usando en alguna literatura.

Tabla 6.1 Filum/Orden, Familia, Género, Especie de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. Las citas referidas describen a las especies y/o comprueban su capacidad de nodulación.

Filum/Orden,Familia/Género/Especie	Referencia
α-Proteobacteria-Orden Rhizobiales	
Rhizobiaceae	
<i>Rhizobium</i>	
<i>R. leguminosarum</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>trifolii</i> , <i>viceae</i>	Frank, 1879, 1889; Jordan, 1984
<i>R. galegae</i>	Lindström, 1989
<i>R. tropici</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> 1991
<i>R. etli</i>	Segovia <i>et al.</i> 1993
<i>R. giardinii</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>giardinii</i>	Amarger <i>et al.</i> 1997
<i>R. gallicum</i>	Amarger <i>et al.</i> 1997
<i>R. hainanense</i>	Chen <i>et al.</i> 1997
<i>R. mongolense</i>	van Berkun <i>et al.</i> 1998
<i>R. huautlense</i>	Wang <i>et al.</i> 1998
<i>R. etli</i> biovar <i>mimosae</i>	Wang <i>et al.</i> 1999a

Tabla 6.1 Continúa.

Filum/Orden,Familia/ Género/Especie	Referencia
<i>R. yanglingense</i>	Tan et al. 2001
<i>R. sullae</i>	Squartini et al. 2002
<i>R. indigoferae</i>	Wei et al. 2002
<i>R. loessense</i>	Wei et al. 2003
<i>R. daejeonense</i>	Quan et al. 2005
<i>R. lusitanum</i>	Valverde et al. 2006
<i>R. selenireducens</i>	Hunter et al. 2007
<i>R. miluonense</i>	Gu et al. 2008
<i>R. multihospitium</i>	Han et al. 2008
<i>R. oryzae</i>	Peng et al. 2008
<i>R. pisi</i>	Ramirez-Bahena et al. 2008
<i>R. alamii</i>	Berge et al. 2009
<i>R. tibeticum</i>	Hou et al. 2009
<i>R. alkalisoli</i>	Li et al. 2009
<i>R. mesosinicum</i>	Lin et al. 2009
<i>R. fabae</i>	Tian et al. 2008
<i>R. vignae</i>	Ren et al. 2011
<i>R. tubonense</i>	Zhang et al. 2011
Ensifer (Sinorhizobium)	
<i>E. meliloti</i>	Dangeard, 1926; Jordan et al. 1984; Chen et al. 1988; de Lajudie et al. 1994; Young, 2003
<i>E. fredii</i>	Scholla & Elkan, 1984; Chen et al. 1988; de Lajudie et al. 1994
<i>E. xinjiangense</i>	Chen et al. 1988
<i>E. saheli</i>	de Lajudie et al. 1994
<i>E. teranga</i>	de Lajudie et al. 1994
<i>E. medicae</i>	Rome et al. 1996
<i>E. arboris</i>	Nick et al. 1999
<i>E. kostiense</i>	Nick et al. 1999
<i>E. kummerowiae</i>	Wei et al. 2002
<i>E. morelense</i>	Wang et al. 2002
<i>E. americanum</i>	Toledo et al. 2003

Tabla 6.1 Continúa.

Filum/Orden,Familia/Género/ Especie	Referencia
<i>E. adhaerens</i>	Casida, 1982; Young, 2003; Willems <i>et al.</i> 2003
<i>E. mexicanus</i>	Lloret <i>et al.</i> 2007
<i>E. chiapanecum</i>	Rincon-Rosales <i>et al.</i> 2009
<i>E. garamanticus</i>	Merabet <i>et al.</i> (2010)
<i>E. numidicus</i>	Merabet <i>et al.</i> (2010)
Allorhizobium*	
<i>A. (Rhizobium) undicola</i>	de Lajudie <i>et al.</i> 1998a; Young <i>et al.</i> 2001
Agrobacterium*	
<i>A. (Rhizobium).adiobacter/ tumefasciens</i>	Cummings <i>et al.</i> 2009
Shinella	
<i>S. kummerowieae</i>	Lin <i>et al.</i> 2008
Bradyrhizobiaceae	
Bradyrhizobium	
<i>B. japonicum</i>	Jordan, 1984
<i>B. elkani</i>	Kuykendall <i>et al.</i> 1992
<i>B. liaoningense</i>	Xu <i>et al.</i> 1995
<i>B. yuanmingense</i>	Yao <i>et al.</i> 2002
<i>B. canariense</i>	Vinuesa <i>et al.</i> 2005a
<i>B. jicamae</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> 2009
<i>B. pachyrhizi</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> 2009
<i>B. iriomotense</i>	Islam <i>et al.</i> 2008
Bradyrhizobium (Blastobacter)	
<i>B. denitrificans**</i>	van Berkun & Eardly, 2002; van Berkun <i>et al.</i> 2006**
Xanthobacteraceae	
Azorhizobium	
<i>A. caulinodans</i>	Dreyfus <i>et al.</i> 1988
<i>A. doebereineriae</i>	Moreira <i>et al.</i> 2006
Phyllobacteriaceae	
Mesorhizobium	
<i>M. loti</i>	Jordan <i>et al.</i> 1984; Jarvis <i>et al.</i> 1982; Jarvis <i>et al.</i> 1997
<i>M. huakuii</i>	Chen <i>et al.</i> 1991; Jarvis <i>et al.</i> 1997

Tabla 6.1 *Continúa.*

Filum/Orden,Familia/Género/ Especie	Referencia
<i>M. ciceri</i>	Nour et al. 1994; Jarvis et al. 1997
<i>M. tianshanense</i>	Chen et al. 1995; Jarvis et al. 1997
<i>M. mediterraneum</i>	Nour et al. 1995; Jarvis et al. 1997
<i>M. plurifarum</i>	De Lajudie et al. 1998b
<i>M. amorphae</i>	Wang et al. 1999b
<i>M. chacoense</i>	Velásquez et al. 2001
<i>M. temperatum</i>	Gao et al. 2004
<i>M. septentrionale</i>	Gao et al. 2004
<i>M. albiziae</i>	Wang et al. 2007
<i>M. caraganae</i>	Gu et al. 2008
<i>M. gobiense</i>	Han et al. 2008
<i>M. tarimense</i>	Han et al. 2008
<i>M. shangrilense</i>	Li et al. 2009
<i>M. australicum</i>	Nandasena et al. 2009
<i>M. opportunistum</i>	Nandasena et al. 2009
<i>M. metallidurans</i>	Vidal et al. 2009
<i>M.alhagi</i>	Chen et al. 2010
Phyllobacterium	
<i>P. trifolii</i>	Valverde et al. 2005
<i>P. ifriqiense</i> ***	Mantelin et al. 2006
<i>P. leguminum</i> ***	Mantelin et al. 2006
Methylobacteriaceae	
Methylobacterium	
<i>M. nodulans</i>	Sy et al. 2001, Jourand et al. 2004
Brucellaceae	
Ochrobactrum	
<i>O. lupini</i>	Trujillo et al. 2005
<i>O. cytisi</i>	Zurdo-Pineiro et al. 2007
<i>O. ciceri</i>	Imran et al. 2010
Hyphomicrobiaceae	
Devosia	
<i>D. neptunia</i>	Rivas et al. 2002, 2003

Tabla 6.1 Continúa.

Filum/Orden,Familia/Género/ Especie	Referencia
<i>D. yakushimensis</i>	Bautista et al. 2010
β-Proteobacteria Orden Burkholderiales	
Burkholderiaceae	
<i>Burkholderia</i> ****	Moulin et al. 2001
<i>B. tuberum</i>	Vandamme et al. 2002
<i>B. phymatum</i>	Vandamme et al. 2002
<i>B. caribensis</i>	Achouak et al. 1999; Vandamme et al. 2002
<i>B. dolosa</i> (<i>B.cepacia</i> genomovar VI)	Vandamme et al. 2002; Vermis et al. 2004
<i>B. mimosarum</i>	Chen et al. 2006
<i>B. nodosa</i>	Chen et al. 2007
<i>B. sabie</i>	Chen et al. 2008
<i>Cupriavidus</i> (<i>Ralstonia</i>)	
<i>C. (Ralstonia) taiwanensis</i> *****	Chen et al. 2001; Vandamme & Conye 2004

Notas:

* Se propuso incluir a las especies *Agrobacterium* como *A. tumetaciens* (syn. *A. adiobacter*), *A. rhizogenes*, *Arubi* y *A. vitis* y *Allorhizobium undicola* (Young et al., 2001) y *A. larrimoorei* (Young 2004) en *Rhizobium*.

** Estos autores no describieron estas especies, pero descubrieron que pueden formar nódulos en leguminosas y la propusieron para que se incluyera en el género *Bradyrhizobium*.

*** Fueron aislados de nódulos, pero su capacidad de nodular no fue comprobada.

**** Estos autores no describieron el género, pero descubrieron que pueden formar nódulos en leguminosas

***** El género *Wautersia* (Vanechoutte et al., 2004) y más tarde del género *Cupriavidus* (Vandamme y Conye, 2004) fueron propuestos para acomodar dichas especies de *Ralstonia*.

Las leguminosas contienen alrededor de 20 mil especies, distribuidas en las subfamilias Caesalpinoideae (2250 spp., en su mayoría plantas tropicales leñosas), Mimosoideae (3270 spp. plantas leñosas, del trópico, subtropico y zona templada) y Papilionoideae (13.800 spp., en su mayoría herbáceas) (Lewis et al., 2005). El alcance de la simbiosis con BFNFL entre leguminosas queda todavía sujeta a investigación. Hasta 1989, únicamente el 57% del género y el 20% de las espe-

cies habían sido examinadas por la formación de nódulos y los porcentajes de las especies que sí podían formar nódulos se encontraron en porcentajes de 23, 90 y 97% entre Caesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoidae, respectivamente (Faria *et al.*, 1989). Aunque se han llevado a cabo búsquedas extensivas para nuevos géneros y especies formadoras de nódulos, especialmente en Brasil (Magalhães *et al.*, 1982; Faria *et al.*, 1989; Moreira *et al.*, 1992), se estima que hoy en día, únicamente el 25% de las especies existentes han sido examinadas. De esta manera, es posible que nuevas simbiosis se identifiquen en el futuro, en ecosistemas naturales (por ejemplo, en selvas tropicales); tradicionalmente, la taxonomía del BFNFL estaba basada en cepas aisladas de cultivos de zonas templadas. Sin embargo, ahora que se encuentran disponibles las que han sido aisladas de otras especies y regiones, y que han sido desarrolladas nuevas técnicas de genética molecular, ha ocurrido una revolución en la taxonomía con 90 especies y 10 géneros adicionales a las 4 especies y a los 2 géneros originales enlistados por Jordan, en 1984 (véase Tabla 6.1), y se esperan más revisiones en un futuro. Tres especies de los géneros descritos de BFNFL no fueron incluidas en la tabla porque no fueron aisladas de nódulos ni la capacidad de nodulación se comprobó hasta el momento: *Rhizobium cellulosilyticum* (García-Fraile *et al.*, 2007), *Bradyrhizobium betae* (Rivas *et al.*, 2004) y *Mesorhizobium thiogangeticum* (Ghosh *et al.*, 2006)

EVALUACIÓN DE DIVERSIDAD DE BFNFL EN EL SUELO

Los estudios sobre poblaciones y diversidad de BFNFL dependen de un aislamiento exitoso de nódulos de raíces y ocasionalmente de tallos, de leguminosas hospederas; los nódulos pueden muestrearse en plantas cultivadas en el campo (colecciones *in situ*), aunque este método puede resultar difícil en el caso de hospederas perennes o leñosas (Moreira *et al.*, 1992; Odee *et al.*, 1995). Para poder aislar o enumerar BFNFL en una población microbiana diversa, como la que surge en el suelo, se requiere de un método que separe claramente BFNFL de otras especies bacterianas y que permita un muestreo fácil y sistemático de los nódulos. El proceso de infección de la planta es el resultado de la formación de nódulos en sí, para poder estimar la población de BFNFL en el suelo. El cultivo posterior y caracterización de BFNFL y de los nódulos, puede proveer información sobre la composición taxonómica de poblaciones de BFNFL y determinar el grado de especificidad entre cepas específicas y candidatos hospederos. Aunque algunas plantas hospederas se consideran muy promiscuas, por ejemplo, muestran una

baja especificidad, ningún hospedero promiscuo puede ser nodulado por todas las especies o cepas existentes de BFNFL y, de manera contraria, no existe ninguna cepa de BFNFL que sea lo suficientemente promiscua como para nodular a todas las especies leguminosas. Para poder evaluar la diversidad de BFNFL en el suelo, es deseable hacer uso de una variedad de especies de plantas hospederas candidatas y cuantas más sean empleadas, más variedad resultará de cepas de BFNFL, aisladas e identificadas.

El bioensayo para BFNFL puede hacer uso de hospederos promiscuos, cultivados en muestras de suelo tomadas del campo o inoculadas con suspensiones del suelo (Moreira *et al.*, 1993; Odee *et al.*, 1997; Pereira, 2000). Las especies encontradas posteriormente deberían compararse con las especies que forman nódulos en el lugar, de manera natural. Aunque algunas de las asociaciones mencionadas pueden ser relativamente específicas, la comparación de BFNFL, aisladas de nódulos formados de manera natural, con los que se muestrea con el bioensayo, representa una comprobación útil de la exactitud del procedimiento en el laboratorio; por ejemplo: *Macroptilium atropurpureum* es uno de los hospederos ampliamente conocido (Vicent, 1970), pero, en la mayoría de los casos, se reporta que suele estar nodulado por la especie *Bradyrhizobium* (Woomer *et al.*, 1988a); también cabe la posibilidad de que sea nodulado por especies de rápido crecimiento como *Rhizobium* (Pereira, 2000; Lima, 2007) y *Burkholderia*, entre otras (Moreira *et al.*, 2002; Moreira, 2006 y 2008, Lima *et al.*, 2009). Resultados preliminares de Taita, punto de referencia CSM-BGBD, en Kenia, indican que *M. atropurpureum* fue nodulado, en la mayoría de los casos, por *Bradyrhizobium* spp., de crecimiento lento. De manera similar, Lewin *et al.*, 1987 demostraron que *Vigna unguiculata*, normalmente considerada como hospedero de *Badyrhizobium*, de hecho, tiene una especificidad muy baja y puede ser nodulada por *Rhizobium* spp., de rápido crecimiento. Resultados obtenidos en Brasil (Alto río Solimões) muestran que caupí (*Vigna unguiculata*) captura más especies que *M. atropurpureum* y que el frijol *Phaseolus vulgaris*, y, únicamente, siratro (*Macroptilium atropurpureum*) atrapa BFNFL en los 98 puntos de muestreo del proyecto CSM-BGBD (Lima *et al.*, 2009). Por lo anterior, se recomienda llevar a cabo experimentos preliminares para cada tipo de suelo. Antes de escoger las plantas hospederas para realizar un bioensayo, donde sea posible, debería incluirse una especie leguminosa nativa como trampa hospedera.

La nitrogenasa es la enzima responsable de la reducción del gas nitrógeno a amoníaco. También reduce, entre otros sustratos, acetileno a etileno (Dilworth, 1966;

Schollhorn Burris, 1966). Esta reacción se utiliza como técnica para medir la actividad de la nitrogenasa; la gran ventaja de un ensayo de reducción de acetileno (ERA), es que destaca por su gran sensibilidad y velocidad, es barato y fácil de realizar aun en condiciones de campo. Aunque el uso de ERA para obtener estimaciones cuantitativas de fijación de nitrógeno a la nutrición de la planta ha sido ampliamente discutido (Boddey, 1987; Giller, 1987), resulta muy útil para la detección simple de fijadores de nitrógeno. Por ejemplo, dado que la anatomía de los nódulos varía ampliamente en forma y en tamaño, el personal que no posee la suficiente experiencia podrá confundirlos con estructuras no inducidas por BFNFL. El ensayo también puede usarse para confirmar una nueva simbiosis de BFNFL o en el caso de nódulos no usuales (Moreira *et al.*, 1992). La actividad de la nitrogenasa constituye una información invaluable porque en muchos casos es imposible verificar que los nódulos aún son efectivos y viables (color interior rojo), puesto que deben quedarse intactos para su aislamiento posterior o secarse cuando requieran ser almacenados durante un largo periodo. Los nódulos sin actividad de la nitrogenasa pueden estar senescentes o ser inefectivos.

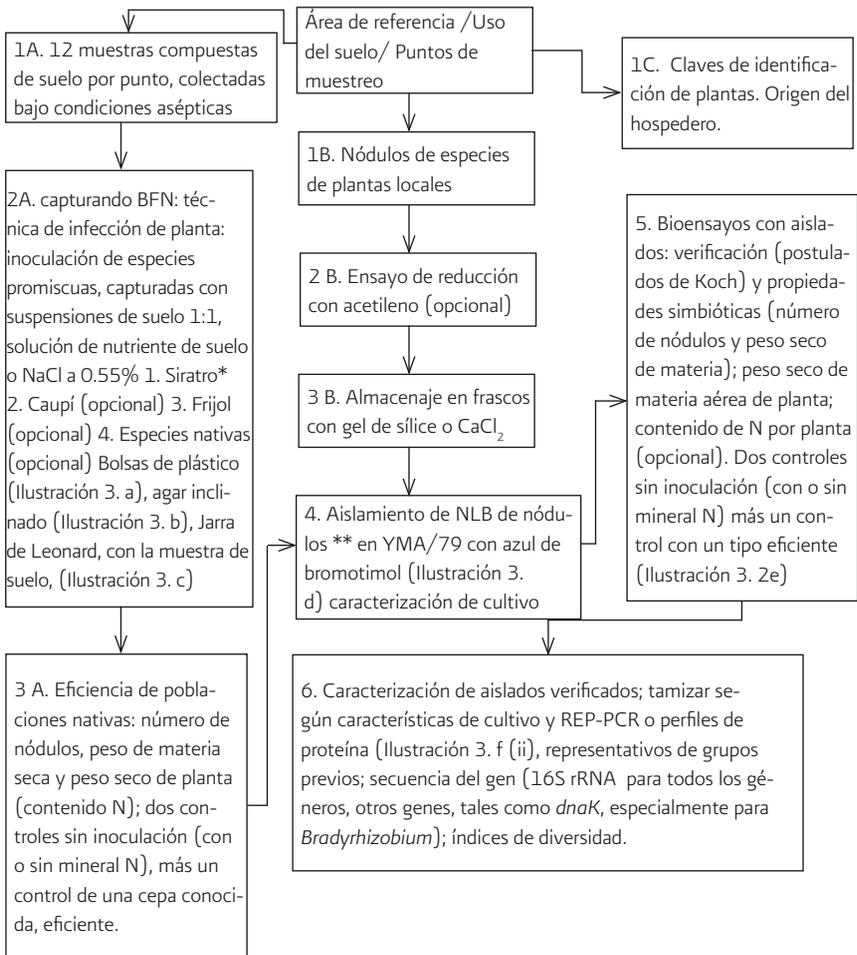
METODOLOGÍA APLICADA EN EL PROYECTO CSM-BGBD: UNA REVISIÓN GENERAL

Los pasos utilizados en la metodología para la caracterización de BFNFL, aplicados en el proyecto CSM-BGBD, se encuentran resumidos en la Figura 6.1, cuyos seis pasos a seguir se muestran en la ilustración 3a hasta la 3f. Una descripción previa fue hecha por Moreira en 2004.

Paso 1A: recoger muestras de suelo del campo, tal y como se describe a continuación.

Paso 2A: para el proyecto se utiliza el método convencional de uso de especies promiscuas, como trampas para aislar las BFNFL de las muestras del suelo; sin embargo, el uso de especies múltiples no es viable con un gran número de puntos de referencia (por ejemplo 100), dado lo afanoso del procedimiento, y estará limitado por el tiempo disponible y las facilidades que ofrezca el laboratorio. Es por ello que se emplea una única especie promiscua como trampa. Bajo estas circunstancias, resulta idóneo *Macrotium atropurpureum* (siratro), ya que posee pequeñas semillas y resulta fácil de manipular bajo condiciones controladas en bolsas de plástico y jarras de Leonard, con una solución nutritiva, dentro de cámaras de crecimiento o invernadero. Cuando se llevan a cabo varios experimentos, deben utilizarse semillas de la misma procedencia; con esto se

Figura 6.1 Evaluación de bacterias formadoras de nódulos en leguminosas, fijadoras de nitrógeno en diversos sistemas de uso de suelo, resumida en seis pasos.



* Puede usarse para conteo NMP (opcional).

** Algunos nódulos pueden guardarse en gel de sílice para su aislamiento, en caso necesario.

Nota: 1A. Doce muestras en cada punto de muestreo (véase esquema global CSM-BDBG, Capítulo 2). 2A. Captura de BFN, utilizando la técnica de infección de planta. 3A. La eficiencia de poblaciones nativas es evaluada con la floración, cuando se aprecian diferencias significativas entre tratamientos 4. Caracterización de cultivos (son necesarios los experimentos preliminares con suelo de selvas y cultivos de leguminosas para determinar el número de aislamientos requeridos para caracterizar las comunidades de simbioses en su conjunto, basados en una

evita cualquier variación de NFNLB debida a las plantas. Cuando un equipo puede manejar más de una trampa de especies, para trampas promiscuas adicionales se recomienda usar *Vigna unguiculata* (como segunda especie) y *Phaseolus vulgaris* (frijol) como tercera especie. Las semillas que se encuentren disponibles en la localidad proveerán información útil para agricultores del lugar. Las dos especies fueron escogidas por ser bastante promiscuas y porque se cultivan en muchos países. Se selecciona *Phaseolus vulgaris* con base en que en varios países existen datos, aún dispersos, sobre poblaciones de BFNFNL donde se utiliza el frijol común como especie-trampa; esto puede servir como un punto de referencia. Después de las tres especies mencionadas (siratro, caupí y frijol) se pueden seleccionar otras, incluyendo algunas especies nativas que, por supuesto, pueden ser diferentes en cada país. El criterio para la selección debe basarse en que la especie-trampa sea ecológica y económicamente relevante para el país; aunque sería imposible estandarizar esta selección.

Las muestras de suelo en macetas pueden usarse únicamente cuando haya disponibilidad en los laboratorios y se deben seguir todas las técnicas asépticas normales de la microbiología. Los suelos con un alto contenido de N deberán evitarse; otros factores limitantes como deficiencias de macro y micronutrientes, acidez y un alto contenido de Al, deberán corregirse para los ensayos. Las especies-trampas pueden usarse para capturar y contar BFNFNL o simplemente para capturarlas. Dada la complejidad del primer ejercicio, éste no es obligatorio, ni forma parte de la metodología estándar. Para poder capturar BFNFNL, pueden cultivarse especies-trampas en bolsas de plástico, jarras de Leonard o en macetas que contengan las muestras de suelo, las cuales se describen a continuación.

Paso 3 A: aunque la eficiencia bajo condiciones controladas no refleja lo que está pasando *in situ*, debido a diferentes relaciones simbióticas (diferentes especies de plantas) y condiciones ambientales, es fácil de medir y proporciona información útil sobre la variabilidad y eficiencia de las poblaciones nativas; incluso puede indi-

curva de extinción de especies). Incluye características de cultivos obtenidos en el paso número 4, en el tamizado de la colección entera de aislamientos (para conseguir racimos) y elementos repetitivos extragénicos palindrómicos/secuencias de DNA (REP-PCR) (u otros métodos como perfiles de proteínas por electroforesis con SDS-PAGE/poliacrilamida gel puede ser complementario). Representantes de racimos, basados en características de cultivo (si este es el caso) y/u otro método deben ser secuenciados para 16SrRNA y otros genes como dnaK (por ejemplo, *Bradyrhizobium*, aunque también se puede aplicar a otros géneros).

car la existencia de cepas eficientes en las poblaciones del suelo, para una especie hospedera en particular.

Paso 1B/2B, 3B: se recomienda también que las BFNFL sean aisladas de especies leguminosas (nativas e introducidas) que nodulan naturalmente, en los diferentes sistemas de uso de suelo. Una comparación de BFNFL aisladas de nódulos del campo y de nódulos introducidos en una especie-trampa, con una inoculación de suspensiones de suelo, hará posible la mejor evaluación de diversidad y de eficiencia de la especie-trampa. Se sabe que la diversidad genética en poblaciones naturales de las NFNLB del mismo lugar puede presentar diferencias entre los aislados de nódulos, formados en el campo, y los de plantas, cultivadas en una serie de diluciones de suelo, en condiciones de laboratorio (Bala *et al.*, 2001).

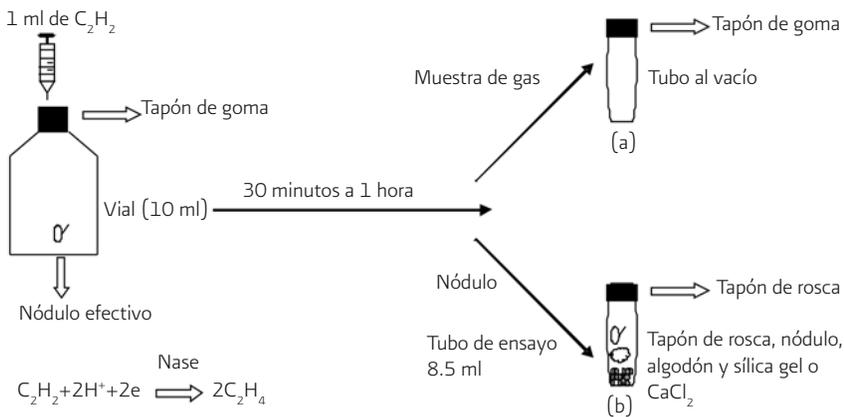
Paso 1C: las especies de leguminosas en un área específica, por ejemplo, de ocho metros de radio alrededor de cada punto de muestreo, deben ser inventariadas para que las relaciones con poblaciones naturales de BFNFL puedan determinarse; tal y como se explicó anteriormente.

Paso 4: después de la aparición y crecimiento de nódulos, las BFNFL deben ser aisladas; los aislados de estos nódulos, junto con los de nódulos recogidos de plantas nativas que naturalmente forman nódulos, pertenecientes a los diferentes sistemas de uso de suelo en cuestión, proporcionarán los datos de la diversidad. Cuando se usa la técnica de infección por planta, los nódulos deberán muestrearse a partir de plantas que nodulen y representen niveles secuenciales de diluciones (Moreira y Pereira, 2001) porque los tipos de BFNFL capturadas pueden variar también con la dilución (Bala *et al.*, 2001). En la literatura se ha discutido que, por lo menos, se necesitan entre 30 y 50 nódulos, y quizá más de 100 por uso del suelo (Jesús *et al.*, 2005), lo que permite la construcción de curvas de muestreo para evaluar si la diversidad en un lugar ya ha sido completamente caracterizada. Considerando que estas curvas se obtienen con base en el número de diferentes cultivos que todavía pueden mostrar características genéticas variables, se necesitarán más aislamientos para obtener una buena resolución. Las curvas de muestreo (acumulación o escasez) pueden revelar el número de aislados requeridos para evaluar correctamente la diversidad. Este número se encuentra en el punto (asíntota) donde la curva alcanza su mayor nivel; en caso de no alcanzarlo, esto indica que no se han detectado todas las especies y que muestras adicionales (aisladas de nódulos) deberán ser analizadas. Se necesitará aplicar las curvas de muestreo a todos los aislados, es decir, a los del bioensayo y a los nódulos colectados en campo. Los nódulos se almacenan en sílica gel (Figura 6.2); de esta forma estarán disponibles para futuros aislamientos.

El aislamiento de BFNFL de nódulos deberá hacerse en el medio 79 con azul de bromotimol (Fred y Waksman, 1928). El medio 79 se conoce también como YMA (Vincent, 1970) (anexo 6.1); esto permite la caracterización completa del cultivo (tasa de crecimiento, cambio de pH, producción de exo-polisacáridos, morfología de colonia, color, tamaño, etc.). Para obtener grupos a partir de estas características de cultivo. La diversidad genética de poblaciones de BFNFL puede evaluarse al agrupar los perfiles que resultan de rep-PCR, utilizando un *software* como Gelcompar (Brujin *et al.*, 1997) o mediante el uso de otra técnica: perfiles de proteínas por electroforesis con gel de SDS-Poliacrilamida; que dan una buena resolución a nivel cepa (Paso 6); sin embargo, esto puede ser opcional, de acuerdo con los recursos disponibles en cada país y debe llevarse a cabo después del paso 5 para evitar perder el tiempo con contaminantes.

Finalmente, los representantes de cultivos de los clados generados mediante el agrupamiento por Rep-PCR u obtenidos mediante otros métodos se secuenciarán para obtener el gen 16SrRNA (Paso 6). Cuando existen recursos suficientes, *dnaK* u otros genes involucrados en el mantenimiento de la bacteria, tales como *atpD*, *rpoB*, *recA*, *glnI* (Parker, 2004; Vinuesa *et al.*, 2005b; Gaunt *et al.*, 2001), pueden ser probados para algunas cepas de género que no hayan sido bien discriminadas por 16 SrRNA, como en el caso de *Bradyrhizobium*.

Figura 6.2 Trabajo de campo: a) toma de muestras de gas del ensayo de nitrogenasa por reducción de acetileno y b) almacenaje de nódulos hasta su aislamiento en el laboratorio. Fuente: Moreira y Pereira, 2001.



REQUERIMIENTO DE MATERIALES PARA TRABAJO DE CAMPO Y LABORATORIO

Trabajo de campo: para muestrear suelo: alcohol al 95%, agua para eliminar el suelo del equipo de muestreo antes de la esterilización con alcohol, caja refrigeradora, bolsas de plástico esterilizadas (300 ml), espátula, bolsas grandes de plástico (5 l) y un pequeño sacabocados. *Para muestrear nódulos:* tijera pequeña, cuchara, azada y azadón, pinzas, pala, tubos de tapón de rosca, sílica gel o CaCl_2 anhidro. *Para resguardo de plantas:* alcohol, prensa y periódico.

Trabajo de laboratorio para aislar y enumerar BFNFNL: pipetas de 1 ml y 5 ml, solución para dilución, matraces Erlenmeyer de 1 L y 125 ml, agitador orbital, bolsas esterilizadas de plástico (125 ml) para crecimiento, tubos de ensayo (150 x 20 ml ó 200 x 30 mm), o botellas de cerveza recicladas, rejillas para bolsas de crecimiento o tubos, solución de nutrientes, semillas de plantas leguminosas hospederas promiscuas o nativas, temperatura ambiente controlada de luz y humedad.

Trabajo de laboratorio para aislamiento de BFNFNL y caracterización de cultivos: cajas Petri, alcohol al 95%, HgCl_2 al 0.1% (acidificado con HCl concentrado a 5ml/L) (Hipoclorito de Na o Ca; puede usarse H_2O_2 para sustituir al HgCl_2), agua esterilizada, pinzas, medio de cultivo que contiene levaduras, manitol y sales minerales (hipoclorito de sodio o calcio, o H_2O_2 (pueden sustituir al HgCl_2), agua esterilizada, pinzas, medio de agar con sales, levadura-manitol-mineral, pH6.8.

Para la actividad de nitrogenasa mediante reducción de acetileno: matraces Kitasato Erlenmeyer, globo de hule, jeringas de 1 ml a prueba de gas, tubos de vacío de 5 ml, frascos de 10 ml o de mayor capacidad con tapones de goma, carburo de calcio CaC_2 , cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama (FID) y columna RN Poropak para determinaciones de acetileno/etileno. Nota: los ensayos de nitrogenasa pueden llevarse a cabo en campo.

MÉTODOS DETALLADOS

Muestreo del suelo. Se saca una muestra de suelo a una profundidad de 20 cm, en 12 puntos, distribuidos alrededor de cada parcela de muestreo (véase Capítulo 2, Figura 2.3). Se utiliza el mismo esquema de extracción del núcleo para el muestreo en todos los grupos microbianos, incluyendo el BFNFNL. Se junta cada juego de 12 muestras, para formar una muestra compuesta de alrededor de 300 g que, posteriormente, se introduce en una bolsa plástica esterilizada. De manera alter-

nativa, cuando lo permitan los recursos, se pueden obtener tres o más muestras compuestas en cada punto. Todas las herramientas: sacabocados, espátulas, azadón, etc. deberán lavarse muy bien con agua para remover partículas de suelo y ser esterilizadas mediante alcohol y flama antes y después de cada muestreo, con el fin de evitar la introducción de BFNFL exóticas. Se deben minimizar las pisadas cerca de los puntos de extracción y la hojarasca deberá ser removida justo antes de que se lleve a cabo el muestreo. Las muestras de suelo se trasladan al laboratorio lo antes posible, utilizando un envase con aislamiento (preferiblemente debe permanecer a 4° C).

Una segunda muestra compuesta de alrededor de 200 g será recogida en una bolsa de plástico no estéril para su análisis físico-químico.

Muestreo de nódulos. Se deberán identificar plantas leguminosas dentro de un radio de 8 m (lo mismo que para un inventario de vegetación) en el punto de muestreo y se recogerá el material vegetal resultante. Será de gran ayuda contar con información previa acerca de cuáles son las especies que pueden nodular, de manera que se confine el muestreo a estas especies en concreto; sin embargo, hay que aclarar que existe un enorme potencial para el descubrimiento de nuevas especies de leguminosas de este tipo. En el caso de plantas herbáceas, se puede extraer todo el sistema de raíces del suelo, utilizando una azada, un azadón o una pala, cuidando no romper nódulos de manera accidental. Los nódulos de plantas leñosas deberán descubrirse extrayendo las raíces y poniendo gran atención para no dañar las ramificaciones delgadas en donde éstos normalmente se encuentran. Se debe verificar, con extremo cuidado, que las raíces delgadas pertenezcan a la planta leguminosa identificada; por este motivo, se recomienda empezar la excavación junto al tallo; se extirpan los nódulos (dejando un pedazo de raíz para facilitar la manipulación) y se guardan en tubos de tapón de rosca con un desecador (Figura 6.2b). Antes del almacenaje, las partículas de suelo deberán removerse, bien por sacudido o bien mediante lavado, retirando el exceso de agua con una servilleta. Por lo menos se recogerán 50 nódulos por cada punto de muestreo y la muestra será representativa de todas las especies nodulantes existentes en la parcela de muestreo. En ocasiones, algunos nódulos pueden ser demasiado grandes para los tubos normales de rosca; deberán ser almacenados en un recipiente de mayor capacidad.

Actividad nitrogenasa. La actividad de nitrogenasa puede medirse en el campo o a partir de cada nódulo, justo después del muestreo o en el laboratorio (Figura 6.2). Se introduce el nódulo en un frasco de tapa de goma de 10 ml o de mayor capacidad, en caso necesario. Se produce acetileno en un matraz Kitasato Erlenmeyer

por la reacción de CaC_2 con agua (Figura 6.3). Si se lleva a cabo el trabajo en laboratorio, se obtiene acetileno de cilindros de gas comerciales. Se inyecta 1 ml de este gas en el frasco que contiene el nódulo. Después de una hora aproximadamente, se remueve 1 ml de gas de la superficie y se transfiere a un tubo al vacío para su posterior análisis de etileno por cromatografía de gases (Figura 6.2a).

Especímenes de resguardos de plantas. Los especímenes de resguardos de plantas nodulantes, deberán recogerse en el área que se encuentra alrededor del punto de muestreo (radio de 8 m). Se debe poner especial atención en el etiquetado (véase a continuación) y si es posible, incluya flores y frutas. Enseguida, los especímenes se mandan al herbario para su identificación junto con una tarjeta de identificación de las mismas:

Proyecto: CSM-BGBD

Colector: Fátima Moreira

Fecha: 2 de abril de 2005

Localidad: Benjamin Constant

Altitud: 500 m

Nombre vulgar de la especie: faveira

Nombre científico de la especie: ¿?

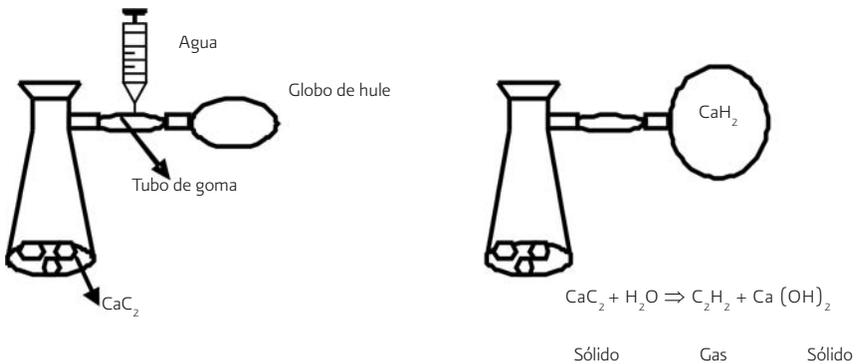
Número de vale: 05

Características del nódulo: crecimiento medio, tamaño 0.5 a 1.5 cm

Descripción del lugar: pastizales abiertos con ganado y troncos de madera

Tipo de suelo: limo arenoso

Figura 6.3 Producción de acetileno en campo o laboratorio.



Características de la planta: herbácea con frutos maduros
Otros comentarios: se recogieron semillas; flores amarillas.

El conteo de BFNFNL. Se someten muestras de suelo a una serie de diluciones antes de la inoculación de las plantas hospederas candidatas (Figura 6.4). La correlación de diluciones varía entre 2.0 (1:2) y 14.5 (1:14.5), según la concentración de células esperada en la muestra. Esto significa una mayor dilución para suelos con más BFNFNL; sin embargo, aún es necesario inocular plantas hospederas en todas sus diluciones (véase a continuación). Asimismo, en cada dilución se debe emplear una réplica del bioensayo (2 a 5 veces). Las plantas se cultivan en condiciones controladas (Vicent, 1970) y después de 15 días, se les examina para ver si han formado nódulos. Las poblaciones de BFNFNL se estiman por el método del Número más Probable (Cochran 1950; Woome *et al.*, 1988b, 1999). En el caso de inocular las plantas únicamente para capturar las BFNFNL, las muestras de suelo deberán resuspenderse en agua esterilizada o en una solución de nutrientes (la misma que se utiliza para un medio de cultivo o crecimiento de plantas) (véase anexo 6.1 y 6.2) en una correspondencia 1:1. Las plantas pueden cultivarse en bolsas de plástico, jarras de Leonard u otro tipo de frasco. Se deben utilizar tres tipos de controles sin inoculante de suelo: el primero comprueba la presencia de contaminación durante los procedimientos experimentales. Si no se mantienen de manera correcta las condiciones axénicas, este control resultará en nódulos y el experimento se invalidará (aún cuando nódulos ocurren en una sola réplica). Se recomienda que el número de réplicas dentro de este control sea mayor que las réplicas de tratamientos de inoculación y el control debe localizarse dentro de diferentes posiciones en el protocolo. Los otros dos controles permitirán comprobar la eficiencia de las comunidades de BFN.

Las comunidades que nodulan la planta hospedera indican si las condiciones del experimento (temperatura, concentraciones de nutrientes) son adecuadas para que se lleven a cabo la nodulación y la fijación de nitrógeno en las plantas y su crecimiento. El primero de los controles se complementa con nitrógeno mineral (para jarras de Leonard, 70 mg N-NH₄NO₃) cada semana desde la tercera hasta la penúltima, pero no se inocula. Para bolsas de plástico o recipientes de pequeños volúmenes, se utiliza una sola aplicación de 70 mg N-NH₄NO₃). De esta manera el caupí, que alcanza su nivel de floración en dos meses, con el uso de jarras de Leonard recibirán un total de 350 mg N-NH₄NO₃, mientras que los frijoles con un periodo de crecimiento de mes y medio, en jarras de Leonard, recibirán 280 mg de N-NH₄NO₃. El otro control se inoculará con un inoculante recomendado para esta

especie de planta; por ejemplo, CIAT 899 para *Phaseolus vulgaris* en Brasil, pero no se añade nitrógeno.

Aislamiento y caracterización de BFNFL. Las BFNFL son aisladas de los nódulos recogidos en campo y por bioensayo en el laboratorio. En el último caso, los nódulos obtenidos en cada dilución sucesiva pueden indicar cuáles son las cepas menos frecuentes en la muestra de suelo y cuáles, las más comunes.

El primer paso será esterilizar la superficie de los nódulos con una breve inmersión en 95% de alcohol, seguida de una inmersión más larga de tres a cuatro minutos en HgCl_2 (hipoclorito de Na o Ca, o H_2O_2 pueden usarse como sustitutos) y lavado mediante varios enjuagues con agua estéril (Vicent, 1970). A continuación se aplasta el nódulo dentro de unas gotas de agua estéril, utilizando pinzas y esto se vierte sobre un medio de agar. En el caso de los nódulos disecados, éstos deben remojarse en una solución de agua esterilizada para mejorar la absorción de la solución desinfectante. Los tiempos de inmersión en HgCl_2 u otros desinfectantes, deberían ajustarse al tamaño del nódulo (más corto para nódulos pequeños).

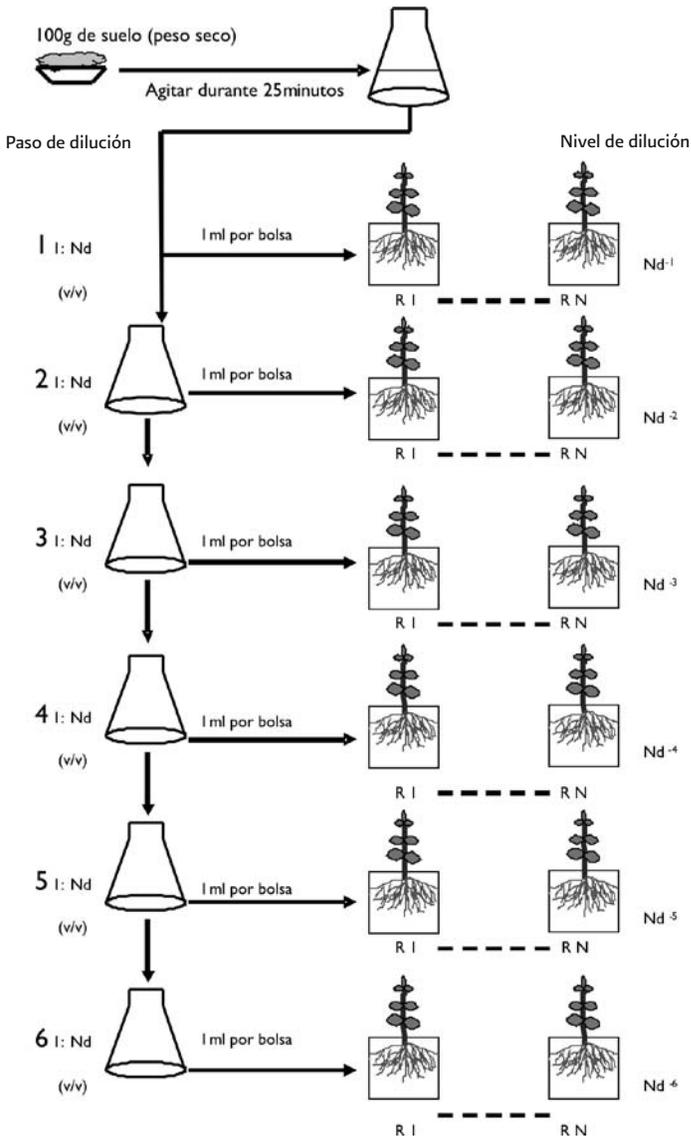
En la composición del medio de agar: levadura-manitol-sales minerales (Fred y Waksman, 1928) (Anexo 6.1), especialmente el pH y la fuente de carbohidrato pueden variarse, tomando en cuenta las condiciones específicas del suelo (Date y Halliday, 1979; Souza *et al.*, 1984; Elkan y Bunn, 1991). Puede incluirse azul de bromotimol como indicador porque los cambios en el pH, causados por la formación de BFNFL, pueden resultar útiles en la identificación de género. Otros caracteres incluyen: la tasa de crecimiento (tiempo TAIC de aparición de colonias aisladas), la cantidad de polisacáridos celulares, forma y tamaño de colonia, diámetro y color según lo descrito por Moreira *et al.* (1993) y Jesús *et al.* (2005).

Los principales descriptores de cada género son:

Allorhizobium, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*: colonias circulares, de 2 a 4 mm de diámetro, normalmente unidas debido a la copiosa producción de polisacáridos extracelulares, convexas, semitraslúcidas, elevadas y mucilaginosas, la mayoría con el centro de color amarillo (debido al indicador de pH), de crecimiento rápido (TAIC: de 2 a 3 días). *Mesorhizobium*: igual que *Rhizobium*, pero normalmente de crecimiento más lento (TAIC: de 4 a 5 días).

Bradyrhizobium: colonias circulares que no exceden de un milímetro de diámetro, producción extracelular de polisacáridos de abundante a escasa (esto último, generalmente en el caso de los tipos que toman más de diez días para su crecimiento), opacas, raramente translúcidas, blancas y convexas, granulares en textura y que producen un cambio de pH a alcalino, de crecimiento lento o muy lento (TAIC: de 6 a más días).

Figura 6.4 Método para calcular el número más probable de células de rizobia en el suelo mediante la técnica de infección de plantas.



El porcentaje base de la dilución (Nd) puede variar de 1:2 hasta 1:14.5 y el número de replicas por dilución (N) de 2 a 5.

Fuente: adaptado de Wooster, 1993 y Vincent, 1970 por Moreira y Pereira, 2001.

Azorhizobium: colonias circulares, de 0.5 mm de diámetro, de color cremoso, muy poca producción extracelular de polisacáridos (mucho menos que en el caso de *Bradyrhizobium*), producen un cambio de pH a alcalino, de crecimiento rápido a medio (TAIC: de 3 a 4 días).

Cupriavidus: similar a *Azorhizobium*, con un poco más de producción extracelular de polisacáridos.

Burkholderia: con características de crecimiento muy similares a las de crecimiento rápido; por ejemplo *Rhizobium*, con la excepción de modificación de pH porque pueden producir una reacción ácida o alcalina (dependiendo de la edad), a veces, al mismo tiempo.

Las BFNFL son bastoncillos Gram negativos que no forman esporas y que, generalmente, contienen gránulos refráctiles de poly- β -hidroxibutirato en microscopio de contraste de fases. Las cepas aisladas deben reconfirmarse como BFNFL, mediante una demostración en la que formen nuevos nódulos en una planta hospedera de prueba, bajo condiciones bacteriológicas controladas, de acuerdo con los postulados de Koch. En la Tabla 6.1 se pueden observar referencias que ofrecen amplios detalles de las características de especies de NFNLB. La diversidad de cepas, dentro de la especie puede ser genéticamente y fenotípicamente alta; por ejemplo, en sus características simbióticas, morfológicas y fisiológicas; por lo tanto, será necesario definir el nivel apropiado de diversidad que permita caracterizar géneros y especies específicos. Graham *et al.*, (1991) aportaron estándares mínimos para la descripción de nuevos géneros y especies, donde incluyeron serología (Dudman y Belbin, 1988), lipopolisacáridos celulares (De Maagd *et al.*, 1988), patrones totales de proteína por SDS-PAGE (Dreyfus *et al.*, 1988; Moreira *et al.*, 1993), secuencia de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (Young y Haukka, 1996), perfiles de plásmidos (Giller *et al.*, 1989), resistencia intrínseca a los antibióticos (RIA) (Kingsley y Bohlool, 1983), electroforesis de enzimas metabólicas (Selander *et al.*, 1986), crecimiento en diferentes fuentes de carbono (Dreyfus *et al.*, 1988), hibridación DNA:DNA, composición de bases de DNA (%C + G), hibridación rRNA-DNA y polimorfismos en los tamaños de fragmentos de restricción del DNA. Recientemente, se han descrito nuevas técnicas para la caracterización de los procariotes; lo que mejora no sólo la clasificación bacteriana, sino también la capacidad de discriminación dentro de diferentes taxas: cada una tiene un nivel específico de resolución para la clasificación bacteriana, lo que puede ser muy útil para numerosos estudios. Estas técnicas, también conocidas como huellas

genómicas, incluyen: la digestión de DNA genómico con endonucleasas que cortan sitios (de restricción) poco frecuentes seguido por PFGE (Electroforesis en Gel en Campos Pulsados) y otros métodos de RFLP. Los métodos basados en la reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), tales como ARDRA (Análisis de Restricción del rDNA Amplificado), tRNA-PCR o ITS (Amplificación y Análisis del tRNA y de Regiones Intergénicas del 16S-23S rRNA), AFLP (Polimorfismo de Tamaño de Fragmentos Amplificados) para el análisis de todo el genoma, RAPD (DNA *polimórfico amplificado al azar*): AP-PCR (PCR Con Arimers Arbitrarios), REP-PCR (Huellas Genómicas de Elementos Genómicos Repetidos de DNA,) (Rademaker y Bruijn, 1997; Bruijn *et al.*, 1997). Los análisis numéricos con un número adecuado de cepas y la comparación con las cepas de BFNFL permiten la caracterización de grandes poblaciones. La caracterización genética de DNA (secuencia del 16S, 23S rARN u otras secuencias de genes, homología DNA:DNA) requiere de mucho tiempo y de equipo especializado y, normalmente, se restringe únicamente a representantes de grupos; por otro lado, si existe disponibilidad de recursos, la secuenciación de genes específicos puede aplicarse directamente a un número de cepas determinado por las curvas de rarefacción o acumulación.

Los costos y beneficios de una caracterización previa y secuenciación de representantes *versus* una secuenciación directa de un número mayor de aislados, deben tomarse en cuenta. Los costos de la secuenciación de DNA se han reducido notablemente durante los últimos años y, en algunos casos, la secuenciación directa de 16S rARN u otros genes puede ofrecer ventajas económicas. Empresas privadas dan buenos servicios para productos PCR y su purificación y secuenciación. Por ejemplo, la purificación y secuenciación de un fragmento de genes (una muestra) ya amplificada por PCR, en la actualidad, puede costar alrededor de US \$6, si se piden las placas completas de 96 muestras. El número total de placas de 96 muestras cuesta alrededor de US \$350 para la secuenciación.

Extracción de DNA: el DNA genómico es aislado de cultivos de fases log en 79/YMA durante diferentes periodos de incubación, dependiendo de la tasa de crecimiento específica para cada cepa (de 2 a 10 días). Se pueden utilizar el kit "Ultraclean" para el aislamiento de DNA de suelo de los laboratorios MOBIO o cualquier otro kit recomendado por el productor. Se cuantifica el DNA a A_{260} nm con un espectrofotómetro o se estima por comparación con diferentes estándares de concentraciones de DNA en geles de agarosa. Alternativamente, para cada tipo se suspende una azada con bacterias de una colonia aislada en 1 ml de agua

esterilizada, lo que produce una suspensión ligeramente turbia que posteriormente se hierve durante cinco minutos para lisar las células; se utiliza un volumen de esta suspensión como templado para el PCR.

Secuenciación 16S rDNA. Los genes casi completos del 16S rDNA se amplifican con un par de oligonucleótidos 27F (pA: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (5'GGTACCTTGTTACGACTT), usando los aislamientos representativos de diferentes grupos (obtenidos bien por caracterización de cultivo, perfiles REP-PCR, o bien, por otras técnicas). Estos pares de oligonucleótidos corresponden a posiciones 8-27 y 1507-1492, respectivamente, del gen 16S del RNA ribosomal de *Escherichia coli* (Wilson *et al.*, 1990). Otros oligonucleótidos pueden utilizarse si permiten la síntesis de un gen 16S rARN casi completo. Las concentraciones finales en las mezclas de reacción (100 ml) son: 1 x PCR Buffer, 2.5 mm MgCl₂, 0.2 mm de cada dNTP, 0.2 µm de cada oligonucleótido y dos unidades de la enzima Taq polimerasa (DNA extraído o cultivos líquidos): 6 µl. El programa para PCR incluye un paso inicial: desnaturar a 94°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturación a 94°C durante 40 segundos, apareamiento a la temperatura de 55°C, durante 40 segundos, con extensión a 72°C durante 90 segundos. La extensión final se lleva a cabo a 72°C, durante 7 minutos. La purificación de los productos PCR se hace con filtros Microcon™ (Millipore) o mediante otros métodos de purificación. Un paso de secuenciación del PCR amplificado se obtiene con el primer 27F, pero también con el primer reverso 1492R. Cuando se requiere la secuencia de todo el gen se deben elegir otros *primers* internos y usarse para amplificar y secuenciar el fragmento del gen que falte después de utilizar 27F y 1492R.

Análisis filogenético. Se comparan las secuencias con otras conocidas contenidas en las bases de datos, tales como la del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/), el *European Bioinformatics Institute* (EBI) secuenciación de base de datos (www.ebi.ac.uk) y el *Ribosomal Database Project* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

MANTENIMIENTO Y COLECCIÓN DE CULTIVOS PUROS

Normalmente, los cultivos puros se mantienen en agar inclinado dentro de tubos de tapa rosca en el mismo medio de cultivo, similares a los presentados en la Figura 6.2. Sin embargo, la viabilidad de dichos cultivos no es larga: los métodos como liofilización y almacenaje en un congelador (-80°C) garantizan una larga conservación de las células viables.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales por sus comentarios y revisiones a los Drs. Esperanza Martínez, David Odee y Nancy Karanja.

REFERENCIAS

- Achouak, W., Christen, R., Barakat, M., Marlet, M.H. y Heulint, T. (1999) '*Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol 49, pp.787-749.
- Amarger, N., Macheret, V. y Laguerre, G. (1997) '*Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 47, pp996-1006.
- Bala, A., Murphy, P., Giller, K. E. (2001) 'Genetic diversity of rhizobia varies from natural populations with the soil dilution sampled', *Soil Biology and Biochemistry*, vol 33, pp841-843.
- Bautista, V.V., Monsalud, R.G. y Yakta, A. (2010) '*Devosia yakushimensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol 60, pp627-632.
- Berge, O., Lodhi, A., Brandelet, G., Santealla, C., Roncato, M., Christien, R., Heulin, T. y Achouak, W. (2009) '*Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol 59, pp367-372.
- Boddey, R. M. (1987) 'Methods for quantification of nitrogen fixation associated with Graminae', *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol 16, pp209-266.
- Burns, R. C. y Hardy, R. W. F. (1975) *Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants*, Springer-Verlag, New York.
- Casida Jr, L. E. (1982) '*Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: A bacterial predator of bacteria in soil', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 32, pp339-345.
- Chen, W. M., De Faria, S. M., Chou, J., James, E. K., Elliot, G. N., Sprent, J. I., Bontemps, C., Young, J.P.W y Vandamme, P. (2008) '*Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol 58, pp2174-2179.
- Chen, W. M., De Faria, S. M., J., James, E. K., , Elliot, G. N., Lin, K. Y., Chou, J.H., Sheu, S. Y., Cnockaert, M., Sprent, J. I., y Vandamme, P. (2007) '*Burkholderia nodosa* sp. nov.,

- isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*' *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 57, pp1055-1059.
- Chen, W. M., James, E. K., Coenye, T., Chou, J., Barrios, E., Faria, S. M., Elliot, G. N., Shen, S., Sprent, J. I. y Vandamme, P. (2006) '*Burkholderia mimosarum* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 56, pp1847-1851.
- Chen, W. M., Laevens, S., Lee, T. M., Coenye, T., Vos, P., Mergeay, M. y Vandamme, P. (2001) '*Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol 51, pp1729-1735.
- Chen, W. M., Zhu, W.F., Bontemps, C., Young, J.P.W y Wei, G.M. (2010) '*Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol 60 pp958-962.
- Chen, W. X., Li, G. S., Qi, Y. L., Wang, E. T., Yuan, H. L. y Li, J. L. (1991) '*Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 41, pp275-280.
- Chen, W. X., Tan, Z. Y., Gao, J. L., Li, Y. y Wang, E. T. (1997) '*Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 47, pp870-873.
- Chen, W. X., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X. y Li, Y. (1995) '*Characteristics of Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 45, pp153-159.
- Chen, W. X., Yan, G. H. y Li, J. L. (1988) 'Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 38, pp392-397.
- Cochran, W.G. (1950) Estimation of bacterial densities by names of the "most probable number", *Biometrics*, vol. 6, pp105-116.
- Cummings, S.P., Gyaneshwar, P., Viniesa, P. Farruggia, F.T., Andrews, M., Humphry, D., Odee, D., Moreira, F.M.S., Sprent, J.I., Young, J.P.W. y James, E.K. (2009) 'Nodulation of *Sebania* species by *Rhizobium* (*Agrobacterium*) strain IRBG74 and other rhizobia' *Environmental Microbiology*, vol 11, pp2510-2525.
- Dangeard, P. A. (1926) '*Recherches sur les tubercles radicaux des légumineuses*', *Botaniste (Paris)*, vol 16, pp1-275.

- Date, R. A. y Halliday, J. (1979) 'Selecting *Rhizobium* for acid, infertile soils of the tropics', *Nature*, vol 277, pp62–64.
- Date, R. A. y Halliday, J. (1987) 'Collection, isolation, cultivation and maintenance of rhizobia', in G. H. Elkan (ed) *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*, Marcel Dekker Inc, New York.
- De Bruijn, F. J., Davey, M. E., McSpadden-Gardener, B., Millcamps, A., Rademaker, L. W., Ragatz, D., Schultz, M. L., Struffi, P. y Stoltzfus, J. (1997) 'Molecular approaches in microbial ecology to assess genomic diversity and stress-induced gene expression in plant-associated diazotrophs', in C. Elmerich, A. Kondrosi and W. E. Newton (eds) *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- De Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., Torck, U., Coopman, R., Collins, M. D., Kersters, K., Dreyfus, B. y Gillis, M. (1998a) '*Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov. nitrogenfixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 48, pp1277–1290.
- De Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M. D., Lindstrom, K., Dreyfus, B. y Gillis, M. (1998b) 'Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 48, pp369–382.
- De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K. y Gillis, M. (1994) 'Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium melliloti* com. nov.; *Sinorhizobium saheli* sp. nov.; and *Sinorhizobium teranga* sp. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 44, pp715–733.
- De Maagd, R. A., van Rossum, C. y Lugtenberg, J. J. (1988) 'Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides', *Journal of Bacteriology*, vol 170, pp3782–3785.
- Dilworth, M. J. (1966) 'Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations of *Clostridium pasteurianum*', *Biochemica et Biophysica Acta*, vol 127, pp285–294.
- Dreyfus, B., Garcia, J. L. y Gillis, M. (1988) 'Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 38, pp89–98.
- Dudman, W. F. y Belbin, L. (1988) 'Numerical taxonomic analysis of some strains of *Rhizobium* spp. that uses a qualitative coding of immunodiffusion reactions', *Applied and Environmental Microbiology*, vol 54, pp1825–1830.
- Elkan, G. H. y Bunn, C. R. (1991) 'The Rhizobia', in A. Balows, M. Dworkin, H. G. Schlegel and H. Truper (eds), *The Prokaryotes, 2nd Edition*, Springer-Verlag, Berlin.

- Faria, S. M., Lewis, G. P., Sprent, J. I. y Sutherly, J. M. (1989) 'Occurrence of nodulation in the Leguminosae', *New Phytologist*, vol 111, pp 607–619.
- Frank, B. (1879) 'Ueber die Parasiten in den Wurzelan-schwillungen der Papilionaceen', *Botanik Zeitung*, vol 37, pp376–387, 394–399.
- Frank, B. (1889) 'Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen', *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, vol 7, pp332–346.
- Fred, E. B. y Waksman, S. A. (1928) *Laboratory Manual of General Microbiology*, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York and London.
- Gao, J. L., Turner, S. L., Kan, F. L., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Qiu, Y. H., Terefework, Z., Young, J.P. W., Lindstrom, K. y Chen, W. X. (2004) '*Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov. isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol5, pp2003–2012.
- García-Fraile, P., Rivas, R., Willems, A., Peix, A., Martens, M., Martínez-Molina, E., Mateos, P.F. y Velázquez, E. (2007) *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 57, pp 844-848.
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A. y Young, J. P. W. (2001) 'Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 51, pp2037–2048.
- Giller, K. E. (1987) 'Use and abuse of the acetylene reduction assay for measurement of "associative" nitrogen fixation', *Soil Biology and Biochemistry*, vol 19, pp783–784.
- Giller, K. E., McGrath, S. P. y Hirsch, P. R. (1989) 'Absence of nitrogen fixation in clover grown on soil subject to long-term contamination with heavy metals is due to survival of only ineffective *Rhizobium*', *Soil Biology and Biochemistry*, vol 21, pp 841–848.
- Ghosh, W. y Roy, R. (2006) '*Mesorhizobium thiogangeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 56, pp91-97.
- Graham, P. H., Sadowsky, M. J., Keyser, H. H., Barnet, Y.M., Bradley, R. S., Cooper, J. E., de Ley, J., Jarvis, B. D. W., Roslycky, E. B., Strijdom, B. W. y Young, J. P. W. (1991) 'Proposed minimum standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 41, pp 582–587.
- Gu, C.T., Wang, E.T., Tian, C.F., Han, T.X., Chen, W.F., Sui, X.H. y Chen, W.X. (2008) *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root

- nodules', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol58, pp1364-1368.
- Guan, S.H., Chen, W.F., Wang, E.T., Lu, Y.I., Yan, X.R., Zhang, X.X. y Chen, W.X. (2008). *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. in China', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol58, pp2646-2653.
- Han, T.X., Han, L.L., Wu, L.J., Chen, W.F., Sui, X.H., Gu, J.G., Wang, E.T., y Chen, W.X. (2008) *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 58, pp2610-2618.
- Han, T.X., Wang, E.T., Wu, L.J., Chen, W.F., Gu, J.G., Gu, C.T., Tian C.F. y Chen, W.X. (2008) '*Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 58, pp1693-1699.
- Hou, B.C., Wang, E.T., Li, Y., Jia, R.Z., Chen, W.F. Gao, Y., Dong, R.J. y Chen, W.X. (2009) '*Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (irj.) Vassilcz', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 59, pp3051-3057.
- Hunter, W.J., Kuykendall, L.B. y Manter D.K. (2007) '*Rhizobium selenireducens* so. nov.: a selenite-reducing (alpha)-Protobacteria isolated from a bioreactor' *Current Microbiology*, vol 55, pp455-460.
- Imran, A., Hafeez, F. Y., Frühling, A., Schumann, P., Malik, K. A. y Stackebrandt, E. (2010) '*Ochrobactrum ciceri* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 60: 1548 - 1553.
- Islam, M.s., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagaka, Y. e Seky, T. (2008) '*Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., Isolated from a Tumor-Like Root of the Legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan', *Biosci. Biotechnol. Biochem* vol 72, pp1416-1429.
- Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E. y Patel, J. J. (1982) '*Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 32, pp378-380.
- Jarvis, B. D. W., van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernyez, M. P., Cleyet-Marel, J. C. y Gillis, M. (1997) 'Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 47, 895-898.
- Jesus, E. C., Florentino, L. A., Rodrigues, M. I. D., Oliveira, M. y Moreira, F. M. S. (2005) 'Leguminosae nodulating bacteria diversity from three different land use

- systems in Brazilian Western Amazon', *Pesquisa agropecuária Brasileira*, vol 40, pp769–776.
- Jordan, D. C. (1984) '*Rhizobiaceae* Conn 1938', in N. R. Krieg and J. D. Holt (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, London.
- Jourand, P., Giraud, E., Bena, G., Sy, A., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B. y de Lajudie, P. (2004) '*Methylobacterium nodulans* sp.nov., for a group of aerobic facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen fixing bacteria', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 54, pp2269–2273.
- Kingsley, M. T. y Bohlool, B. B. (1983) 'Characterization of *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence, immunodiffusion and intrinsic antibiotic resistance', *Canadian Journal of Microbiology*, vol 29, pp518–526.
- Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E. y Udell, S. (1992) 'Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov.', *Canadian Journal of Microbiology*, vol 38, pp501–505.
- Lewin, A., Rosenberg, C., Meyer, H., Wong, C. H., Nelson, L., Manen, J. F., Stanley, J., Dowling, D. N., Dénarie, J. y Broughton, W. J. (1987) 'Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*', *Plant Molecular Biology*, vol 8, pp447–459.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. y Lock, M. (2005) *Legumes of the world*, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Li, L.Y., Chen, W.F., Han, L.L., Wang E.T. y Chen, W.X. (2009) '*Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 59, pp3006–3011.
- Li, L.Y., Chen, W.F., Wang, F.Q., Hu, D., Wang E.T., Sui, X.H. y Chen, W.X. (2009) '*Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana species*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 59, pp3012–3018.
- Lin, D.X., Chen, W.F., Wang, F.Q., Hu, D., Wang, E.T., Sui, X.H. y Chen, W.X. (2009) '*Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legume', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 59: 1919 - 1923.
- Lin, D.X., Wang E.T., Tang, H., Han, T.X., He, Y.R., Guan, S.H. y Chen, W.X. (2008) '*Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 58, pp1409–1413.

- Lima, A. S. (2007) 'Densidade, eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam o siratro (*Macropodium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental', PhD Thesis, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.
- Lima, A.S., Nóbrega,R.S.A., Barberi, A., Silva, K. Ferreira, D.F. y Moreira, F.M.S. (2009) 'Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macropodium atropurpureum*)' *Plant and Soil*, vol 319, PP.127-145.
- Lindström, K. (1989) '*Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 39, pp365–367.
- Llorente, L., Ormeno-Orrillo, E., Rincon, R., Martínez-Romero, J., Rogel-Hernández, M.A. y Martínez-Romero, E. (2007) '*Ensifer mexicanus* sp. nov. a new specie nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology*, vol 30, pp280-290.
- Magalhães, F.M.M., Magalhães, L.M.S., Oliveira, L.A. y Döbereiner, J. (1982) 'Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais nativas de terra firme da região de Manaus-AM', *Acta Amazônica*, vol 12, pp509-514.
- Mantelin, S., Fischer-Le Saux, M., Zakhia, F., Béna, G., Bonneau, S., Jeder, H., de Lajudie, P. y Cleyet-Marel, J.C. (2006) 'Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 56, pp827-839.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. B., Franco, A. A., Graham, P. y Pardo, M. A. (1991) '*Rhizobium tropici*, a new species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* trees', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 41, pp417–426.
- Merabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., Domergue, O., Coopman, R., Bekki, A., Mars, M., Willems, A. y de Lajudie, P. (2010) Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 60: 664 - 674.
- Moreira, F. M. S. (2004) 'Methodology for the inventory of nitrogen-fixing Leguminosae nodulating bacteria', *Conservation and Sustainable Management of Below-ground Biodiversity CSM-BGBD*, Annual meeting report 4, Nairobi, Kenya.

- Moreira, F. M. S. (2006) 'Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating bacteria', in F. M. S. Moreira, J. O. Siqueira and L. Brussaard (eds) *Soil Biodiversity in Amazonian and other Brazilian Ecosystems*, CAB International, Wallingford, 280pp.
- Moreira, F. M. S. (2008) 'Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae', in F. M. S. Moreira, J. O. Siqueira and L. Brussaard (eds) *Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros*, Editora, UFLA, Lavras, 768pp.
- Moreira, F. M. S. y Pereira, E. G. (2001) 'Microsymbionts: rhizobia', in M. Swift and D. Bignell (eds) *Standard Methods for Assessment of Soil Biodiversity and Land Use Practice*, International Centre for Research in Agroforestry, Bogor, Indonesia (available at <http://fao.org/AG/agl/agll/soilbiol/docs/manual-soil%2>).
- Moreira, F. M. S., Cruz, L. M., Faria, S. M., Marsh, T., Martínez-Romero, E., Pedrosa, F. O., Pitard, R. y Young, P. J. W. (2006) '*Azorhizobium doebereinae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers.', *Systematic and Applied Microbiology*, vol 29, pp197–206.
- Moreira, F. M. S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K. y Franco, A. A. (1993) 'Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins', *Systematic and Applied Microbiology*, vol 16, pp135–146.
- Moreira, F. M. S., Silva, M. F. y Faria, S. M. (1992) 'Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil', *New Phytologist*, vol 121, pp563–570.
- Moreira, F. M. S., Tiedje, J. y Marsh, T. L. (2002) '*Burkholderia* spp. are among fast growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazônia and from Brazilian Leguminosae forest species', *Memorias da XXI Reunión Latinoamericana de rizobiología*, Cocoyoacan, México.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., y Bolvin-Masson, C. (2001) 'Nodulation of legumes by members of the b sub-class of *Proteobacteri*', *Nature*, vol 411, pp948–950.
- Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Willems, A. y Howieson, J.G. (2009) '*Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 59, pp2140–2147.
- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. y Lidstrom, K. (1999) '*Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya', *International Journal of Systematic Microbiology*, vol 49, pp1359–1368.
- Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Beck, D., Effosse, A. y Fernandez, M. P. (1994) 'Genotypic y phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.)', *Canadian Journal of Microbiology*, vol 40, pp345–354.

- Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Normy, P. y Fernandez, M. P. (1995) 'Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 45, pp640–648.
- Odee, D. W., Sutherland, J. M., Kimiti, J. M. y Sprent, J. I. (1995) 'Natural rhizobial populations and nodulation status of woody legumes growing in diverse Kenyan conditions', *Plant and Soil*, vol 173, pp211–224.
- Odee, D. W., Sutherland, J. M., Makatiani, E. T., McNroy, S. G. y Sprent, J. I. (1997) 'Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions', *Plant and Soil*, vol 188, pp65–75.
- Parker, M. A. (2004) 'rRNA and *dnaK* relationships of *Bradyrhizobium* sp. nodule bacteria from four Papilionoid legume trees in Costa Rica', *Systematic and Applied Microbiology*, vol 27, pp334–342.
- Peng, G., Yuan, Q., Li, H., Zhang, W. y Tan, Z. (2008) '*Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 58, pp2158–2163.
- Pereira, E. G. (2000) 'Diversity of rhizobia isolated from different land use systems in Amazon region', PhD Thesis, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil.
- Quan, Z., Bae, H., Baek, J., Chen, W., Im, W. y Lee, S. (2005) '*Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 55, pp2543–2549.
- Rademaker, J. L. W. y de Bruijn, F. D. (1997) 'Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis', in G. Caetano-Anollés, and P. M. Gresshoff (eds) *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews*, John Wiley and Sons Inc, New York.
- Ramírez-Bahena, M.H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J.M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2008) 'Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889^{AL}, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926^{AL} and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926^{AL}. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 58, pp2484–2490.
- Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Willems, A. y Velázquez, E., (2009) '*Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules

- of *Pachyrhizus erosus*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 59, pp5217-5222.
- Ren, D.W., Chen, W.F., Sui, X.H., Wang, E.T. y Chen, W.X. (2011) '*Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 61, pp580-586.
- Rincón-Rosales, R., Llorente, L., Ponce, E. y Martínez-Romero, E. (2009) 'Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*', *FEMS Microbiology Ecology* Vol 68, pp255.
- Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N., Mateos, P. F., Gillis, M., Dazzo, F. D. y Martínez-Molina, E. (2002) 'A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce', *Applied and Environmental Microbiology*, vol 68, pp5217-5222.
- Rivas, R., Willems, A., Subba-Rao, N., Mateos, P. F., Dazzo, F. D., Kroppenstedt, R. M., Martínez-Molina, E., Gillis, M. y Vizcaíno, N. (2003) 'Description of *Devosia neptuniae* sp.nov. that nodulates and fix nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India', *Systematic and Applied Microbiology*, vol 26, pp47-53.
- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J.L. García-Benavides, P., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Gillis, M. y Velázquez, E. (2004) *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations' *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 54, pp1271-1275.
- Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normy, P. y Cleyet-Marel, J. C. (1996) '*Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 46, pp972-980.
- Scholla, M. H. y Elkan, G. H. (1984) '*Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 34, pp484-486.
- Schollhorn, R. y Burris, R. H. (1966) 'Study of intermediates in nitrogen fixation', *Proceedings of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol 24, p710
- Segovia, L., Young, J. P. W. y Martínez-Romero, E. (1993) 'Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 43, pp374-377.
- Selyer, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. y Whittam, T. S. (1986) 'Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics', *Applied and Environmental Microbiology*, vol 51, pp873-884.

- Souza, L. A. G., Magalhaes, F. M. M. y Oliveira, L. A. (1984) 'Avaliação do crescimento de rhizobium de leguminosas florestais tropicais em diferentes meios do cultura', *Pesquisa Agropecuária Brasileira – Edição Especial* 19, s/n.
- Squartini, A., Struffi, P., Döring, H., Selnska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., Vendramin, E., Velázquez, E., Mateos, P. F., Matínez-Molina, E., Dazzo, F. B., Casella, S. y Nuti, M. P. (2002) '*Rhizobium sullae* sp. nov. (formely '*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 52, pp1267–1276.
- Sy, A., Giraud, E., Joury, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. y Dreyfus, B. (2001) 'Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes', *Journal of Bacteriology*, vol 183, pp214–220.
- Tan, Z. Y., Kan, G. X., Wang, E. T., Reinhold-Hurek, B. y Chen, W. X. (2001) '*Rhizobium yanglingense* sp. nov. isolated from arid and semi-arid regions in China', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 51, pp901–914.
- Tian, C.F., Wang, E.T., Wu, L.J., Han, T.X., Chen, W.F., Gu, C.G., Gu, J.G. y Chen, W.X. (2008) '*Rhizobium favae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*', 58: pp 2871–2875.
- Toledo, I., Lloret, L. y Martínez-Romero, E. (2003) '*Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating *Acacia* spp. in Mexico', *Systematic and Applied Microbiology*, vol 26, pp54–64.
- Trujillo, M. E., Willens, A., Abril, A., Planchuelo, A., Rivas, R., Ludeña, D., Mateos, P. F. y Martínez-Molina, E. (2005) 'Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov.', *Applied and Environmental Microbiology*, vol 71, pp1318–1327.
- Valverde, A., Igual, J.M., Peix, A., Cervantes, E. y Velazquez, E. (2006) '*Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodules *Phaseolus vulgaris*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 56, pp. 2631–2637.
- Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R. y Mateos, P. F. (2005) '*Phylobacterium trifolii* sp. nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 55, pp1985–1989.
- Van Berkum, P. y Eardly, B. D. (2002) 'The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*', *Applied and Environmental Microbiology*, vol 68, pp1132–1136.
- Van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A. y Eardly, B. (1998) '*Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form

- nitrogen fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]'; *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 48, pp13–22.
- Van Berkum, P., Leibold, J. M. y Eardly, B. D. (2006) 'Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsh and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.)', *Systematic and Applied Microbiology*, vol 29, pp207–215.
- Vandamme, P. y Conye, T. (2004) 'Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 54, pp2285–2289.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.-M., de Vos, P. y Willems, A. (2002) '*Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes', *Systematic and Applied Microbiology*, vol 25, pp507–512.
- Vaneeschoutte, M., Kamfer, P., de Baere, T., Falsen, E. y Verschraegen, G. (2004) '*Wautersia* gen. nov. sp. nov., a new genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al, 1990) comb. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 54, pp317–327.
- Velazquez, E., Igual, J. M., Willems, A., Fernyez, M. P., Munoz, E., Mateos, P. F., Abril, A., Toro, N., Normy, P., Cervantes, M., Gillis, M. y Martínez-Molina, E. (2001) '*Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina)', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 51, pp1011–1021.
- Vermis, K., Coenye, T., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Nelis, H.J. y Vandamme, P. (2004) Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* vol 54, pp689–691.
- Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Mauré, L., Escarré, J., Béna, G., Brunel, B. y Cleyet-Marel, J.C. (2009) '*Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis vulneraria* growing on metalicolous soil in Languedoc, France', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 59, pp850–855.
- Vincent, J. M. (1970) *A Manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D. y Martínez-Romero, E. (2005a) '*Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes

- (*Papilionoideae:Genisteeae*) from Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies a and *Bradyrhizobium* genospecies b', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 55, pp569–575.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. y Martínez-Romero, E. (2005b) 'Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: The roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol 34, pp29–54.
- Wang, E. T., van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X. H., Dorado, O., Chen, W. X. y Martínez-Romero, E. (1998) '*Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 48, pp687–699.
- Wang, E. T., Rogel-Hernández, A., Santos, A. G., Martínez-Romero, J., Cevallos, M. A. y Martínez-Romero, E. (1999a) '*Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 49, pp1479–1491.
- Wang, E. T., van Berkum, P., Sui, X. H., Beyene, D., Chen, W. X. y Martínez-Romero, E. (1999b) 'Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 49, pp51–65.
- Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Fernández-López, M., Rinhold-Hurek, B. y Martínez-Romero, E. (2002) '*Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics', *International Journal of Systematic Microbiology*, vol 52, pp1687–1693.
- Wang, F.Q., Wang, E.T., Liu, J., Chen, Q., Sui, X.H., Chen, W.F., y Chen, W.X. (2007) '*Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 57, pp1192–1199.
- Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, M. E., Zhu, M. E. y Chen, W. X. (2002) '*Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 52, pp2231–2239.
- Wei, G. H., Wang, E. T., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z. y Chen, W. X. (2003) 'Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in Loess Plateau region of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 53, pp1575–1583

- Willems, A., Fernández-Lopez, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N. y Gillis, M. (2003) 'Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 53, pp1207–1217.
- Wilson, K. H., Blitchngton, R. B. y Green, R. C. (1990) 'Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction', *Journal of Clinical Microbiology*, vol 28, pp1942–1946.
- Woomer, P. (1993) 'Most Probable Number Counts of Rhizobia in Soils', in J. M. Yerson and J. S. I. Ingram (eds) *Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods*, CAB International, Wallingford, pp172–178.
- Woomer, P., Bennet, J. y Yost, R. (1990) 'Agroclimatology and modeling – overcoming the inflexibility of most-probable-number procedures', *Agronomy Journal*, vol 82, pp349–353.
- Woomer, P., Singleton, P. W. y Bohlool, B. B. (1988a) 'Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils', *Applied and Environmental Microbiology*, vol 54, pp1112–1116.
- Woomer, P., Singleton, P. W. y Bohlool, B. B. (1988b) 'Reliability of the most-probable technique for enumerating rhizobia in tropical soils', *Applied and Environmental Microbiology*, vol 54, pp1494–1497.
- Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J. y Fan, H. (1995) '*Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 45, pp706–711.
- Yao, Z. Y., Kan, F. L., Wang, E. T. y Chen, W. X. (2002) 'Characterization of rhizobia that nodulate legume species within the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmigense* sp. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol 52, pp2219–2230.
- Young, J. M. (2003) 'The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al 1988 and *Sinorhizobium morelense* Wang et al 2002 is a junior synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination "*Sinorhizobium adhaerens*" (Casida 1982) Willems et al 2002 legitimate? Request for an opinion', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 53, pp2107–2110.
- Young, J. M. (2004) 'Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov.' *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, vol 54 pp149.

- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. y Sawada, H. (2001) 'A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al, 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*', *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, vol 51, pp89–103.
- Young J. P. W. y Haukka, K. E. (1996) 'Diversity and phylogeny of rhizobia', *New Phytologist*, vol 133, pp87–94.
- Zhang, R.J., Hou, B.C., Wang, E.T., Li, Y., Zhang, X.X., y Chen, W.X. (2011)'*Rhizobium tubonense* sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*'*International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, vol 61, pp512-517.
- Zurdo-Piñeiro, J.L. , Rivas, R., Trujillo, M.E., Vizcaíno, N., Carrasco, J.A., Chamber, M., Palomares, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. y Velázquez, E. (2007)'*Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain' *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, vol 57, pp784-788.

APÉNDICE 6.1 Composición de medio 79 para el crecimiento de BFN

Medio 79 (Fred y Waksman, 1928) (similar a medio YMA – Vincent, 1970):

10g manitol o sacarosa

1ml sol. K_2HPO_4 (10%) (o 0.1 g l^{-1})

4ml sol. KH_2PO_4 (10%) (o 0.4 g l^{-1})

2ml sol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10%) (o 0.2 g l^{-1})

1ml sol. NaCl (10%) (o 0.1 g l^{-1})

100ml extracto de levadura (o polvo 0.4 g l^{-1})

5ml sol. 0.5% azul de bromotimol en 0.2 N KOH; para hacer 1000 ml con agua destilada pH 6.8–7.0.

Medio sólido: 15g Agar

Medio semisólido: 1.75g Agar

Autoclave a 120°C durante 15 minutos;

Cuando pH <5.0 se reemplaza azul por Azul de Bromotimol por Verde de Bromocresol y se aumenta agar hasta 20 g l^{-1} .

APÉNDICE 6.2 Solución de nutrientes Jensen's para el crecimiento de especies de leguminosas en bolsas de plástico y jarras de Leonard

Componentes	Volumen
K_2HPO_4 (2%)	10 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2%)	10 ml
NaCl (2%)	10 ml
$CaHPO_4$ (10%)	10 ml
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1.7 % o $FeCl_3$ 1%	10 ml
Solución de micronutrientes*	1 ml
Agua destilada (completar a)	1,000 ml

pH = 6.7, ajustar con KOH.

Diluir solución a 1:4.

* Solución de micronutrientes (para 1 l de agua).

H_3BO_3 2.86 g
 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2.03 g
 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22 g
 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.08 g
 $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ 0.09 g

El mismo protocolo que para agar con semillitas. Vicent (1970) recomienda la mezcla para una solución de nutrientes, diluida de la misma manera. También después se usa la solución con sirato en bolsas de plástico.

Control

Se proveen los controles con nitrógeno a una concentración final de aproximadamente 70 ppm N ($0.05\% KNO_3$ o $NH_4 NO_3$). Esto puede añadirse a la solución de nutrientes al principio del experimento, o entre 7 a 10 días después de plantar. Si al final del experimento esto resulta insuficiente para el crecimiento sostenido y el color verde de las plantas control, entonces la concentración puede aumentar o hacer una suplementación dividida. Sin embargo, las concentraciones más altas ($>0.7\% KNO_3$) pueden ser tóxicas. Normalmente, los controles nitrogenados no presentan nódulos, pues las dosis elevadas inhiben la nodulación; por lo tanto, los controles absolutos, es decir, sin inoculación del suelo

son necesarios para comprobar las condiciones asépticas del experimento. Otro control importante, no mencionado por Vincent, es el uso de una cepa eficiente como un control positivo para la nodulación y la fijación de nitrógeno. Si existe la disponibilidad de las cepas recomendadas, éstas deberán utilizarse.

CAPÍTULO 7

Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA)

Joseph D. Bagyaraj y Sidney L. Stürmer

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se encuentra bien documentado que los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) mejoran la salud y el crecimiento de las plantas de importancia agrícola, hortícola y forestal. La red de hifas producidas por los HMA en el suelo durante su asociación con la planta huésped, provee una mayor superficie de absorción que los pelos radiculares y, por lo tanto, aumenta significativamente la captación de iones relativamente inmóviles, tales como fosfato, cobre y zinc. En la mayoría de los suelos tropicales, el fósforo disponible es muy bajo; esto limita el desarrollo de las plantas. Además, se ha demostrado que las plantas micorrizadas tienen mayor tolerancia a metales tóxicos, patógenos de la raíz, sequía, altas temperaturas, salinidad, pH desfavorable del suelo y al choque por trasplante que sufren las plantas no micorrizadas (Mosse *et al.*, 1981; Bagyaraj, 1990; Bagyaraj and Varma, 1995). Los HMA han sido registrados en ecosistemas naturales como desiertos, dunas de arena, selvas tropicales, salinas y sistemas manejados como praderas, huertos y cultivos agrícolas (Brundrett, 1991).

En los trópicos, la agricultura se practica en áreas previamente ocupadas por dos principales ecosistemas naturales ricos en especies vegetales: bosques tropicales y sabanas. La conversión de estos dos ecosistemas en agro-ecosistemas ya sea para agricultura de subsistencia, producción de cultivos redituables o plantaciones forestales industriales provoca cambios en las características químicas

micas, físicas y biológicas del ambiente edáfico. En estos sitios, usualmente, se eliminan muchas especies vegetales de todas las edades y, por lo general, se siembran con una sola especie de la misma edad. La conversión de los ecosistemas naturales para distintos usos de suelo influye en la abundancia de esporas y composición de especies de HMA. Jasper *et al.*, (1987) observaron un descenso en el número de esporas y un cambio en la composición de especies después del disturbio en algunos lugares de Australia. De igual forma, Mason *et al.*, (1992) encontraron que el número de esporas de HMA en una plantación de *Terminalia ivoriensis* en Camerún disminuyó notablemente después de tres meses de una desforestación. También notaron un cambio en la composición de especies. Johnson y Wedin (1997), sin embargo, encontraron una riqueza similar de especies en la selva tropical seca y en praderas con dominio de una especie, en donde se detectaron 28 morfotipos de HMA con *Glomus aggregatum* y dos especies de *Glomus* no descritas, como los hongos dominantes. Asimismo, Picone (2000) demostró que la densidad de esporas y la comunidad fúngica disponible para la formación de micorrizas eran relativamente similares entre praderas y bosque tropical lluvioso.

La medición de la diversidad taxonómica de HMA se ha hecho, generalmente, a través de una cuenta directa y de la identificación de esporas recuperadas del campo. No obstante, estas determinaciones no detectan a las especies crípticas de HMA que no están esporulando en el momento del muestreo (pero que están asociadas con las plantas hospederas) e impiden la adecuada identificación de algunas especies, especialmente de los géneros *Glomus* y *Gigaspora*. Las macetas trampa preparadas con suelo de campo han sido usadas exitosamente para detectar y recobrar especies crípticas durante estudios de diversidad en huertos de manzano en regiones templadas (Miller *et al.*, 1985), pastizales (Bever *et al.*, 1996) y también en desiertos (Stutz and Morton, 1996). Aunque comúnmente no es reportado, las medidas de diversidad taxonómica deberían estar acompañadas de algunas evaluaciones de la actividad de la comunidad micorrízica. La infectividad micorrízica se determina fácilmente por el método del número más probable (NMP) y puede servir para propósitos comparativos (Porter, 1979). La medición del porcentaje de colonización (PC) (Moorman y Reeves, 1979) y la determinación de las unidades de colonización (UC) (Franson y Benthlenfalvay, 1989) son también adecuadas.

TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN DE HMA

Debe establecerse un esquema taxonómico antes de cualquier estudio de diversidad, especialmente, cuando se requieren comparaciones entre los sistemas de uso de suelo. La taxonomía y clasificación de los hongos micorrizógenos han cambiado radicalmente en los últimos años. Gerdemann y Trappe (1974) incluyeron todas las especies de HMA dentro del orden Endogonales en la familia Endogonaceae (División Zygomycota). Morton y Benny (1990) transfirieron todas las especies de HMA al orden Glomerales (División Zygomycota) con tres familias y seis géneros. Datos moleculares y morfológicos fueron usados para transferir a los miembros del género *Sclerocystis a Glomus* (Almeida y Schenck, 1990; Redecker *et al.*, 2000) y para erigir dos nuevos géneros en dos familias distintas (Morton and Redecker, 2001). Schüßler *et al.* (2001) transfirieron todas las especies de HMA a una nueva división monofilética: Glomeromycota, colocando a este grupo de hongos en el mismo nivel que Basidiomycota y Ascomycota. También incluyeron en el Nuevo esquema de clasificación tres nuevos órdenes y varias familias. Recientemente, un género nuevo llamado *Pacispora* fue propuesto por Oehl y Sieverding (2004); La formación de esporas en este género es similar a la de *Glomus* pero éste diferencia paredes germinales internas. Este género es incluido en el orden Diversisporales en la filogenia molecular propuesta por Schüßler *et al.*, (2001). Aunque se han aplicado técnicas moleculares para aclarar la clasificación filogenética entre las especies de HMA, la identificación de especies está basada principalmente en las características morfológicas de las esporas.

Por lo tanto, se propone un esquema de clasificación para estudios de diversidad que surge de los esquemas de Morton y Benny (1990), con aquellos de Morton y Redecker (2001) y Schüßler *et al.*, (2001) (Tabla 7.1).

MÉTODOS PARA EVALUAR PROPÁGULOS INFECTIVOS DE HMA Y COLONIZACIÓN MICORRÍZICA

Número más probable (NMP)

El protocolo propuesto para estimar la diversidad de HMA (descrito en el Capítulo 2) es el mismo que se sigue para todos los microorganismos y no será discutido aquí. El método del Número Más Probable se ha utilizado para estimar el número de propágulos infectivos de HMA en varios suelos. Se basa en una serie de diluciones decimales

Tabla 7.1 Esquema taxonómico propuesto para estudios de diversidad de hongos micorrizógenos arbusculares y caracteres morfológicos que definen los géneros en Glomerales.

División Glomeromycota Schüßler, Scharzott y Walker

Orden Glomerales Morton y Benny

Suborden Glomineae Morton y Benny

Familia Glomeraceae Pirozysnki y Dalpé

Glomus Tulasne y Tulasne (85 especies)

Esporas formadas blásticamente sobre una hifa de sostén, solitarias, en agregados laxos o en esporocarpos. Vesículas de pared delgada y elipsoides. Hifas intrarradicales raramente enrolladas, conectada a una hifa ramificada. La micorriza se tiñe muy oscuro. Arbúsculos con troncos aplanados o cilíndricos adelgazándose sucesivamente en las ramificaciones. Esporas con la pared esporal formada por un número variable de capas todas originadas a partir de la hifa de sostén. No se observan paredes germinales diferenciadas. Germinación a través del lumen de la hifa de sostén o a través de la pared de la espora.

Familia Acaulosporaceae Morton y Benny

Acaulospora Gerd. y Trappe emend. Berch (31 especies)

Esporas formadas a los lados del cuello de un sáculo esporífero el cual deja una cicatriz en la superficie de la espora. Las vesículas varían en forma con protuberancias y concavidades. Hifas intrarradicales rectas o enrolladas cerca de los puntos de entrada. La micorriza se tiñe débilmente. La pared germinal más interna tiene una superficie con excrecencias. Germinación a través de una estructura de germinación esférica, plana, flexible.

Entrophospora Ames y Schneider (cinco especies)

Esporas formadas dentro de un cuello de un sáculo esporífero el cual deja dos cicatrices sobre la superficie de la espora. Vesículas, arbúsculos, hifas intrarradicales y micorriza se tiñen como en Acaulospora. Esporas con la pared esporal formada por dos capas. Otras estructuras subcelulares de la espora y germinación idéntica a la de Acaulospora.

Familia Archaeosporaceae Morton y Redecker

Archaeospora Morton y Redecker (una especie)

Esporas formadas terminalmente de una hifa de sostén o como una ramificación de una estructura que semeja un sáculo esporífero. Los arbúsculos e hifas intrarradicales se tiñen débilmente. Las vesículas y células auxiliares no están diferenciadas. La pared de la espora esta formada por tres o cuatro capas y no se forma una verdadera bicapa germina. Se presentan especies dimórficas formando esporas acaulosporoides y glomoides.

Tabla 7.1 *Continúa*

Familia Ambisporaceae Walter, Vestberg & Schüßler

Ambispora Walter, Vestberg & Schüßler (ocho especies)

Especies generalmente dimórficas con asociaciones micorrizicas produciendo morfotipos acaulosporoide y glomoides. Esporos acaulosporoide formado un apéndice hifal emergiendo lateralmente del cuello de un sáculo esporífero. Esporos glomoides de forma aislada en el suelo o agregados en racimos, y germinan a través de hifa suspensora. Vesículas y arbuscúlos las raíces teñidas en azul franco con azul tripano.

Familia Paraglomeraceae Morton and Redecker

Paraglomus Morton y Redecker (dos especies)

Esporas formadas terminalmente de una hifa de sostén como en *Glomus*. Los arbuscúlos y las hifas intrarradicales se tiñen débilmente. Las vesículas y células auxiliares no están diferenciadas. Las estructuras subcelulares de la espora y la germinación como en *Glomus*.

Familia Pacisporaceae Walker, Blaszkowski, Schüßler y Schwarzott

Pacispora Sieverding y Oehl (siete especies)

Esporas formadas terminalmente de una hifa de sostén (como en *Glomus*). Pared de la espora generalmente formada por tres capas distintas y la pared germinal compuesta también por tres capas. La segunda capa de la pared germinal generalmente reacciona con el reactivo de Melzer. Las paredes de la hifa de sostén son continuas con la primera y segunda capa de la pared esporal. Germinación de la espora directamente de la pared germinal a través de la pared de la espora.

Suborden Gigasporineae Morton y Benny

Familia Gigasporaceae Morton y Benny

Gigaspora Gerd. y Trappe (cinco especies)

Esporas formadas terminalmente sobre una célula esporógena bulbosa; células auxiliares finamente papiladas o equinuladas. No se forman vesículas. Hifas intrarradicales frecuentemente enrolladas, especialmente, cerca de los puntos de entrada; a menudo nodosas o con proyecciones. Arbuscúlos con troncos hinchados angostándose abruptamente en las ramificaciones. Esporas con la pared esporal formada por dos capas permanentes, no se diferencian paredes germinales. Al germinar, se diferencia una capa delgada con verrugas esparcidas y crece un tubo germinativo a través de la pared esporal.

Scutellospora Walker y Sanders (30 especies)

Esporas formadas terminalmente sobre una célula esporógena bulbosa; células auxiliares que van de casi lisas a nodosas. No se forman vesículas. Arbuscúlos e hifas intrarradicales similares en morfología a las de

Tabla 7.1 Continúa

Gigaspora. Esporas con una pared formada por dos capas permanentes y de una a tres paredes germinales internas, cada una con dos capas. El tubo de germinación crece a partir de un escudo flexible plano, que se diferencia sobre la superficie de la última pared germinal.

Fuente: compilado de Morton y Benny, 1990; Oehl y Sieverding, 2004, Spain *et al.*, 2006 y <http://invam.caf.wvu.edu>.

de suelo en donde la presencia o ausencia de colonización micorrízica se registra y da como resultado el número más probable de propágulos infectivos, basándose en una tabla estadística. Una de las desventajas de esta prueba es que se requiere mucho tiempo para la preparación del bioensayo, pero el número calculado tiene hasta un 95 por ciento del nivel de confianza (Adelman y Morton, 1986). La ventaja es que, el análisis de las raíces de las plantas trampa para comprobar la colonización es fácil y rápido, y puede llevarse a cabo por cualquiera que esté familiarizado con la morfología de la micorriza. Como el resultado es un solo número, el método es apropiado para comparaciones entre sistemas con diferente uso del suelo si los ensayos del NMP se establecen de forma simultánea.

Materiales necesarios

- tubetes para plantas (150 X 2.5 cm) y gradillas
- bolsas de plástico (30 X 20 cm)
- diluyente esterilizado (arena: mezcla de suelo 1:1)
- semillas de cebolla.

La planta hospedera recomendada para el ensayo del NMP es la cebolla, ya que es dependiente de la micorriza y las raíces son fáciles de teñir. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro hospedero, si tiene cierta dependencia micorrízica. Si no contamos con semillas de cebolla, se pueden utilizar gramíneas C4, como el sorgo y el *Paspalum*.

Procedimiento

1. Pesar 30 g de suelo de campo en una bolsa de plástico y añadirle 270 g del diluyente esterilizado. Agitar bien para obtener una dilución decimal.
2. Retirar 30 g de la dilución anterior y colocarlo en otra bolsa que contiene 270 g del diluyente estéril. Agitar bien para obtener una dilución 10^{-1} , hacer más diluciones decimales hasta la dilución 10^{-4} (o más, si es necesario).
3. Distribuir el suelo de cada dilución en los tubetes para plantas; hacer cinco replicas por cada dilución.
4. Sembrar las semillas de cebolla en cada tubete, si no se dispone de las semillas de cebolla puede utilizar cualquier otro hospedero (ver arriba).
5. Después de emerger, dejar una sola planta por tubete y dejarlas crecer en un invernadero o en una cámara de crecimiento durante seis semanas.
6. Al cosechar, lavar el suelo de las raíces y teñirlas con azul de tripán (véase más abajo).
7. Bajo un microscopio de disección, determinar la presencia o ausencia de colonización micorrízica en cada réplica. El número de tubetes positivos (los que contienen colonización) en diluciones diferentes se utilizan para calcular los valores de NMP. Utilice las tablas de Cochran (1950), de Fisher y Yates (1963) o Alexander (1965).

El procedimiento para el cálculo del NMP, se ilustra con el siguiente ejemplo. Supongamos que, considerando las cinco réplicas (tubetes) para cada una de los cuatro diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}), se obtiene la siguiente secuencia de números de tubetes positivos: 5, 5, 3, 2. Esto significa que las cinco réplicas fueron positivas para la colonización micorrízica en las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , tres réplicas fueron positivas en la dilución 10^{-3} y dos réplicas fueron positivas en la dilución 10^{-4} . Para el cálculo del NMP, sólo tres números de una secuencia dada son necesarios. El primer número (N1) corresponde al número de tubetes positivos para la colonización micorrízica en la dilución que muestra el mayor número de tubetes positivos (se toma la serie menos concentrada, si el número de tubetes positivos es el mismo en diluciones posteriores). Los otros dos números (N2 y N3) son los correspondientes a las próximas dos diluciones. En este ejemplo, la combinación sería:

$$N1 = 5, N2 = 3 \text{ y } N3 = 2.$$

Usando la tabla del NMP el valor dado para esta combinación de tubetes positivos es 1.4. Para obtener el NMP de propágulos infectivos de HMA en la muestra, este valor debe de ser multiplicado por la dilución media, (en este caso 10^{-3}). Por lo tanto, el suelo tiene 1.4×10^{-3} propágulos infectivos g^{-1} .

Tinción de raíces para observar la colonización micorrízica

La colonización de las células corticales de la raíz por HMA, no altera la morfología de la raíz, en contraste con las asociaciones ectomicorrízicas. Por lo tanto, para detectar y medir la colonización micorrízica, las raíces son sometidas a un procedimiento de clareo y tinción. El método más ampliamente utilizado es el descrito por Philips y Hayman (1970). Kormanik y McGraw (1982) eliminan el fenol en las soluciones para tinción y decoloración, mientras que Koske y Gemma (1989) modificaron el procedimiento mediante la eliminación de ácido láctico de estas soluciones sin interferir con la intensidad de la tinción. Teniendo en cuenta el costo de los productos químicos y el ahorro al reducir el número de productos químicos sin interferir con la calidad de la tinción, se propone para la tinción de raíces el método de Philips y Hayman (1970) modificado por Koske y Gemma (1989).

Materiales necesarios

- solución de KOH al 10% (hidróxido de potasio)
- solución de HCl al 1% (ácido clorhídrico)
- solución acidificada de glicerol, (500 ml de glicerol, 450 ml de H_2O , 50 ml de de HCl al 1%)
- azul de tripano 0.05 % en solución de glicerol (0,5 g/l)
- H_2O_2 alcalinizada (3 ml NH_4OH al 20%, 30 ml de H_2O_2 al 3%, 567ml de agua).

Procedimiento

1. Lavar las raíces para eliminar residuos de suelo y enjuagar con varios cambios de agua.
2. Sumergir las raíces en KOH a $90^\circ C$ por una hora o a $120^\circ C$ por 15 minutos en autoclave.

3. Eliminar el KOH y enjuagar las raíces con agua (dos o tres veces) para quitar el exceso de KOH.
4. Si las raíces están demasiado pigmentadas se deben sumergir en agua oxigenada alcalinizada durante 10-30 minutos. Enjuagar nuevamente las raíces con agua.
5. Sumerga las raíces en HCL al 1% por cinco minutos.
6. Elimine el HCL. No enjuague las raíces en esta paso ya que éstas deben estar acidificadas para una tinción adecuada.
7. Tiña las raíces en una solución de glicerol ácido con azul de tripano a 90°C por una hora o a 120 °C por cinco minutos.
8. Descargue la solución colorante y mantenga las raíces en glicerol acidificado (sin azul de tripano) o agua a temperatura ambiente o 4°C.

Comentarios: si lo desea, la solución de glicerol acidificada puede ser reemplazada por una solución de lactoglicerol (20 ml de ácido láctico, 40ml de glicerol y 40 ml de agua destilada). El paso 4 puede ser omitido si las raíces no están muy pigmentadas; la solución de agua oxigenada alcalinizada debe de prepararse justo antes de su uso. Para almacenar por un tiempo largo, las raíces pueden guardarse en agua adicionada con unas gotas de azida de sodio al 0.01%.

Para los pasos 2 y 7, un baño de agua a 90°C es apropiado para mantener las muestras.

Medición de la colonización micorrízica

La determinación de la colonización micorrízica de la raíz, se realiza con frecuencia en raíces colectadas de campo (sacadas directamente del suelo o de plantas individuales) o en plantas experimentales, crecidas bajo condiciones del invernadero. Esta medida estima el crecimiento de un aislamiento de un hongo o de una comunidad fúngica dentro de la corteza de la raíz. El método de intersección de cuadrante (Giovannetti y Mosse, 1980) que se presenta a continuación, es usado comúnmente para medir la longitud de la raíz y el porcentaje de la colonización micorrízica.

Material necesario

- Cajas de Petri cuadriculadas en la base con cuadrados de 1.1 x 1.1 cm.
- Agujas de disección.

Procedimiento

1. En una caja de Petri extienda al azar las raíces teñidas.
2. Bajo el microscopio de disección explore las líneas horizontales y verticales de la cuadrícula.
3. Registre: a) el número total de intersecciones de las raíces y las líneas de la cuadrícula y b) el número de intersecciones con raíces micorrizadas.
4. Calcule el porcentaje de colonización micorrízica (% CM) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CM} = (\text{Número total de intersecciones con raíces micorrizadas} / \text{Número total de intersecciones entre la raíz y las líneas de la cuadrícula}) \times 100.$$

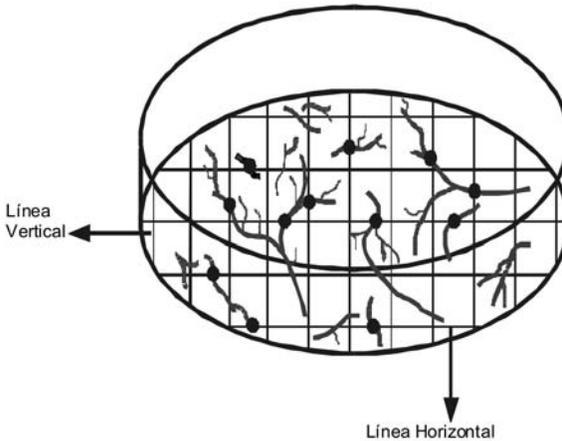
Comentarios: los datos obtenidos en el paso 3, también se pueden utilizar para determinar las longitudes tanto de la raíz completa como de la raíz micorrizada. Si toda la raíz se extiende en la caja de Petri, con las líneas de la cuadrícula separadas en 1.1 cm, el número total de raíces que interceptan las líneas de la cuadrícula, representan la longitud total de la raíz en cm. Por lo tanto, el total de la longitud de la raíz micorrizada será el número de intersecciones, con estructuras micorrízicas. Si se toma una muestra pequeña de toda la raíz, se teñirá y se medirá en el microscopio con este método. Es posible calcular la longitud total de la raíz y la longitud de la raíz micorrizada de la planta completa, usando la relación entre el peso seco de la planta y la submuestra. Para más detalles ver <http://invam.caf.wvu.edu/methods/mycorrhizae/rootlengths.htm>.

Métodos para evaluar la diversidad de HMA

Extracción de esporas del campo

La identificación de las especies de HMA está basada en el análisis de estructuras subcelulares de las esporas asexuales. La morfología del micelio interno y externo durante la asociación micorrízica es prácticamente indistinguible entre las especies del mismo género y entre géneros. En contraste, las estructuras subcelulares de las esporas están altamente conservadas y son fenotípicamente estables independientemente del ambiente y la planta huésped (Morton *et al.*, 1995). De esta manera, las esporas son la única parte del organismo del hongo que puede utilizarse para delimitar las especies. Las esporas se extraen del suelo mediante un tamizado húmedo (Gerdemann y Nicolson, 1963), seguido por centrifugación en un gradiente de sacarosa.

Figura 7.1 Caja Petri con raíces teñidas para marcar la micorrización distribuida uniformemente por el método de intersección de línea.



Nota. En el diagrama las infecciones de micorrizas son representadas con puntos negros. Figura 7.1 provee una ilustración del método de intersección de línea. Ejemplo, después de expandir las raíces, el numero de intersecciones entre una raíz y las líneas horizontales y verticales tendríamos:

- 25 intersecciones (Línea horizontal)
- 18 intersecciones (Línea vertical) y
- 12 intersecciones (Puntos negros) presentando colonización micorrizica.
- Por lo tanto, el largo de la raíz = 43 cm (25 + 18) y el largo de la raíz micorrizada=12 cm (Seis intersecciones positivas sobre líneas horizontales y seis intersecciones positivas sobre líneas verticales).
- El porcentaje de colonización micorrizica= $(12/43) \times 100=27.9\%$.

Materiales necesarios

- Un juego de tamices anidados que tengan al menos 710 μm y 45 μm de abertura de malla.
- Cubeta de plástico o un vaso de precipitados grande.
- Vasos de precipitados, cajas de Petri, vidrio de reloj.
- Tubos para centrífuga y centrífuga.
- Soluciones de sacarosa (20 % y 60%).

Procedimiento

1. Colocar 100 g de la muestra de suelo en la cubeta /vaso de precipitados y suspender en, al menos, 500 ml de agua.
2. Agitar hasta que las esporas queden suspendidas y dejar reposar 30 segundos .
3. Pasar la suspensión repetidamente a través de dos tamices anidados con abertura de malla de 710 μm y 45 μm .
4. Coloque el material retenido en el tamiz de 710 μm en una caja de Petri grande y observe bajo el microscopio de disección para observar esporas grandes (esporas de *Gigaspora* y *Scutellospora*) y esporocarpos.
5. Coloque el material retenido en el tamiz de 45 μm en una vaso de precipitados con una pequeña cantidad de agua; después transfiera este material a un tubo de centrifuga que contenga un gradiente de sacarosa de 20–60%.
6. Centrifugue a 2,000 rpm durante 60 segundos.
7. Vacíe el sobrenadante en el tamiz de 45 μm y lave con agua corriente para quitar el exceso de sacarosa.
8. Transferir las esporas y el material retenido en el tamiz 45 μm a una caja de Petri y bajo el microscopio colecte las esporas en un vidrio de reloj limpio.

Comentarios: en el paso 3, se pueden anidar otros tamices entre los dos recomendados. Esto separa a las esporas por tamaños pero incrementa la cantidad de trabajo ya que el material retenido en cada tamiz debe centrifugarse por separado. Los tamices recomendados (con mallas de 710 μm y 45 μm) son adecuados para recuperar la mayoría de especies, ya que el tamaño de las esporas de HMA para la mayoría de las especies está en un intervalo de 40 a 600 μm . Sin embargo, si hay demasiados pedazos de raíz y otros desechos, es preferible vaciar la suspensión de suelo a través de un tamiz de 1 mm antes de pasar por el tamiz de 710 μm . La solución de sacarosa se hace con azúcar comercial, comprada en el supermercado. Para preparar el gradiente de la sacarosa, agregue 15 ml de la solución de sacarosa al 20% en un tubo de centrifuga de 50 ml y después, en el fondo, agregue otros 15 ml de la solución al 60% . Las esporas pueden separarse de los residuos orgánicos y recogerse de la caja de Petri usando unas pinzas finas o una pipeta Pasteur adelgazada en la punta. En este momento, las esporas se pueden separar por morfotipos de acuerdo con su color y tamaño y si las esporas están en buen estado se pueden identificar hasta género y especie. Los suelos con alto contenido de arcilla pueden obstruir los tamices; se puede agregar una pequeña cantidad de pirofosfato de sodio a 0.1M (Fogel y Hunt, 1979) para dispersar las partículas de arcilla y liberar las aberturas del tamiz.

Identificación de especies y montaje de preparaciones

En la mayoría de los casos, las esporas extraídas del campo no son identificables bajo el microscopio de disección, y por consiguiente, deben ser montadas en portaobjetos y observadas en un microscopio compuesto. Algunas claves de identificación para HMA (por ejemplo Hall y Fish, 1979; Trappe, 1982) se publicaron antes de algunas revisiones de taxonomía recientes e importantes. Koske y Walker (1985) proponen una clave para algunas especies de *Scutellospora* con esporas con paredes ornamentadas, a la vez que Bentivenga y Morton (1995) proponen una clave para identificar las cinco especies de *Gigaspora*. La identificación de especies de HMA se puede hacer por comparación con la descripción original de la especie, usando como referencia al *Manual para la identificación de HMA* (Schenck y Pérez, 1990) y comparando con las descripciones e ilustraciones de las especies proporcionadas por el Dr. Joseph Morton en la INVAM (Colección Internacional de hongos micorrizógenos arbusculares, West Virginia University, W.V., USA) sitio web (<http://invam.caf.wvu.edu>) y por Dr. Janusz Blaszkowski (Department of Plant Pathology of the Agricultural University of Szczecin, Poland) en <http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski>. El manual de Schenck y Pérez es una copia de las descripciones originales de las especies y por lo tanto, alberga todos los problemas inherentes a esas descripciones (falta de estandarización de las estructuras subcelulares de las esporas, falta de buenas fotografías para las comparaciones y las descripciones están hechas con esporas extraídas del suelo de campo por lo cual pueden no incluir características taxonómicas importantes).

Sin embargo, este manual incorpora en un solo volumen toda la descripción de las especies hasta 1990. Por otro lado, la INVAM y el sitio de Blaszkowski poseen excelentes fotografías con detalles de la estructura subcelular de las esporas, el tamaño de las esporas y una descripción estandarizada de las especies de HMA; en estos sitios web se describen 79 y 55 especies respectivamente, de 160 especies de HMA descritas en total. En los anexos 1, 2, 3 y 4 se proporcionan los nombres de las especies y los autores. Fotografías de esporas de especies representativas de diferentes géneros se muestran en las ilustraciones 4 y 5. La ilustración 4 muestra las esporas y las estructuras producidas por las especies de la familia Gigasporaceae (fotografías a, b, c y d) y Acaulosporaceae (e, f, g, y h). La fotografía a) muestran una espora de *Gigaspora albida* con la hifa de sostén bulbosa típica de esta familia, b) espora de *Scutellospora scutata* con la hifa de sostén bulbosa (note el escudo de germinación redondo, café, contrastando con el color hialino de las esporas), c) un detalle de la ornamentación de

la pared de las esporas (verrugas) de *Scutellospora coralloidea*, y d) células auxiliares nodosas que diferencian a los miembros de *Scutellospora*. En la foto e) se muestra una espora de *Entrophospora colombiana* (familia Acaulosporaceae) con la pared de la espora, la pared germinal 1 (gw1) y la pared germinal 2 (gw2) con su capa más interna reaccionando al reactivo de Melzer. Una espora de *Entrophospora colombiana* mostrando las dos cicatrices características se ve en la foto f). La fotografía g) representa una espora de *Acaulospora scrobiculata* que muestra la cicatriz que queda en la espora después de que el sáculo esporífero se desprende; finalmente, se observan, en la foto h), esporas de *Acaulospora* sp. mostrando algunos sáculos esporíferos adheridos a las esporas. La ilustración 6 muestra a las esporas y estructuras producidas por especies de la familia Glomeraceae (a, b, c, d), Archaeosporaceae (e y f) y Paraglomeraceae (g y h). Foto a): espora de *Glomus clarum* indicando la hifa de sostén (note que la capa más interna de la pared de la espora se desprende y se ve parecida a la pared germinal. La foto b) muestra la pared de la hifa de sostén continua con la pared de la espora de un *Glomus* sp. Un esporocarpio de *Glomus clavispورا* se observa en la foto c) y un esporocarpio de *Glomus* sp, en la foto d). La foto e) muestra una espora de *Archaeospora leptoticha* con el sáculo esporífero, la foto f) muestra un detalle de *Archaeospora leptoticha* en donde se observan protuberancias y depresiones de las capas 2 y 3 de la pared esporal (indicada con flechas), la foto g) ejemplifica la estructura de la pared formada por tres capas (L1, L2 y L3) de *Paraglomus occultum* y en la foto h) se muestra una espora de *Paraglomus brasilianum*, también con la pared formada por tres capas (L1, L2 y L3) (la capa L2 está ornamentada con pequeñas crestas).

Las características taxonómicas importantes que pueden observarse bajo el microscopio de disección son tamaño de las esporas, color, forma, presencia de hifa de sostén, de células suspensoras y del sáculo esporífero (raramente observado en esporas recolectadas directamente del campo). En el microscopio compuesto pueden observarse algunas características taxonómicas importantes como son la presencia y tipo de ornamentación sobre la pared de la espora, reacción al Melzer, número de paredes germinales y grosor de la pared de la espora. Las esporas necesitan montarse en líquidos de montar permanentes como son el PVLG (alcohol polivinílico lactoglicerol) y PVLG mezclado con reactivo de Melzer.

Materiales necesarios

- Portaobjetos, cubreobjetos y etiquetas
- Agujas de disección

- Solución de PVLG (100 ml de agua destilada, 100 ml de ácido láctico, 10 ml de glicerol, 16.6 g de alcohol polivinílico (PVA))
- Reactivo de Melzer (100 g de hidrato de cloral, 100 ml de agua destilada, 1.5 g Iodo, 5 g de yoduro de potasio. Mezclar el reactivo de Melzer con el PVLG (1:1) para preparar la solución de PVLG + Melzer.

Procedimiento

1. En un porta objetos, colocar una gota de PVLG y una gota de la solución de PVLG + Melzer.
2. Colocar las esporas al centro de cada gota usando un pinza fina o una micropipeta (en este caso, tenga cuidado de no agregar demasiada agua).
3. Con una aguja de disección, mezcle las esporas en la solución de PVLG y de PVLG + Solución de Melzer y deje secar la superficie de la gota por lo menos cinco minutos.
4. Coloque suavemente un cubre objeto sobre la gota de PVLG y otro cubreobjetos sobre la gota de PVLG + Solución de Melzer.
5. Usando una aguja de disección, rompa cada espora individualmente bajo el microscopio de disección. Este paso es importante para exponer las paredes germinales y sus capas.
6. Etiquetar las preparaciones incluyendo número de muestra, género y especie (si se conoce), y fecha.
7. Guardar las preparaciones a temperatura ambiente durante cinco días y luego incubar a 40-60°C, durante dos días para endurecer el medio de montaje.

Comentarios: el paso 2 es crucial para el montaje de las esporas sobre el portaobjetos; si se agrega demasiada agua, las esporas se deslizan hasta los bordes cuando se coloca el cubreobjetos en la parte superior de cada gota.

Establecimiento de cultivos trampa

Los cultivos trampa se utilizan con más frecuencia en estudios de diversidad de HMA porque revelan las especies que no están esporulando en el campo, en el momento del muestreo. Además, ofrecen esporas nuevas y saludables que pueden ser utilizadas para establecer cultivos puros de HMA. El método propuesto se basa en los protocolos de Stutz y Morton (1996).

Materiales necesarios

- Arena estéril
- Macetas de plástico de 1.5 kg
- Bandejas o bolsas de plástico
- Semillas de *Sorghum sudanense* (Sorgo) y *Vigna unguiculata* (Frijol)

Procedimiento

1 En una bandeja de plástico (o en una bolsa de plástico), homogeneizar el suelo de campo con arena estéril (50% de suelo de campo y 50% de arena).

2 Colocar esta mezcla en macetas de plástico de 1,5 kg y sembrar abundantemente con una mezcla de semillas de sorgo y frijol (40-50 semillas por maceta). Cubrir las semillas con la mezcla de suelo y arena.

3. Después de tres a cuatro meses, bajo condiciones del invernadero, colecte uno o dos núcleos de suelo de 50 ml de cada maceta, extraer las esporas e identificarlas, según lo explicado arriba.

Comentarios: es importante que, durante el muestreo de suelo de campo, se incluyan las raíces de las plantas ya que también sirven como propágulos para iniciar los cultivos trampa. En el paso 2, si el sorgo y frijol no están disponibles, otras plantas hospederas pueden utilizarse. Se recomienda cualquier gramínea C4 y/o leguminosa como hospederas. Bever *et al.* (1996) utilizan un procedimiento diferente para establecer cultivos trampa, llamado "cultivos trampa de trasplante", donde las plantas intactas colectadas del campo se trasplantan a una maceta con un sustrato libre de HMA y se evalúa la esporulación después de tres a cuatro meses.

REFERENCIAS

Adelman, M. J. y Morton, J. B. (1986) 'Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: Influence of host-soil diluent combinations on MPN estimates and percentage colonization', *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 18, pp. 7-13.

Alexander, M. (1965) 'Most-Probable-Number Method for Microbial Populations', in A. Klute (ed) *Methods of Soil Analysis, Part 2: Chemical and Microbiological Methods*, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp. 1467-1472.

Almeida, R. T. y Schenck, N. T. (1990) 'A Revision of the Genus *Sclerocystis* (Glomaceae, Glomales)', *Mycologia*, vol. 82, pp. 703-714.

- Bagyaraj, D. J. (1990) 'Ecology of vesicular-arbuscular mycorrhizae', in D. K. Arora, B. Rai, K. G. Mukerjee and G. R. Knudsen (eds) *Handbook of Applied Mycology: Soil and Plants*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Bagyaraj, D. J. y Varma, A. (1995) 'Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and plants: Their importance in sustainable agriculture and in arid and semiarid tropics', *Advances in Microbial Ecology*, vol. 14, pp. 119–142.
- Bentivenga, S. P. y Morton, J. B. (1995) 'A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters', *Mycologia*, vol. 87, pp. 720–732.
- Bever, J. D., Morton J., Antonovics, J. y Schultz, P. A. (1996) 'Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland', *Journal of Ecology*, vol. 84, pp. 71–82.
- Brundrett, M. C. (1991) 'Mycorrhizas in natural ecosystems', *Advances in Ecological Research*, vol. 21, pp. 171–213.
- Cochran, W. G. (1950) 'Present status of biometry', *Biometrics*, vol. 6, pp. 75–78.
- Fisher, R. A. y Yates, F. (eds) (1963) *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*, Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Fogel, R. y Hunt, G. (1979) 'Fungal and arboreal biomass in a Western Oregon Douglas-fir ecosystem: Distribution pattern and turnover', *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 9, pp. 245–256.
- Franson, R. L. y Bethlenfalvay, G. J. (1989) 'Infection unit method of vesicular-arbuscular mycorrhizal propagule determination', *Soil Science Society of America Journal*, vol. 53, pp. 754–756.
- Gerdemann, J. W. y Nicolson, T. H. (1963) 'Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting', *Transactions of the British mycological Society*, vol. 46, pp. 235–244.
- Gerdemann, J. W. y Trappe, J. M. (1974) 'Endogonaceae in the Pacific Northwest', *Mycologia Memoir*, vol. 5, pp. 1–76.
- Giovannetti, M. y Mosse, B. (1980) 'An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots', *New Phytologist*, vol. 84, pp. 489–500.
- Hall, I. R. y Fish, B. J. (1979) 'A key to the Endogonaceae', *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 73, pp. 261–270.
- Jasper, D. A., Robson, A. D. y Abbott, L. K. (1987) 'The effect of surface mining on the infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi', *Australian Journal of Botany*, vol. 35, pp. 641–652.

- Johnson, N. C. y Wedin, D. A. (1997) 'Soil carbon, nutrients and mycorrhizae during conversion of dry tropical forest to grassland', *Ecological Applications*, vol. 7, pp. 171–182.
- Kormanik, P. P. y McGraw, A. C. (1982) 'Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots', in N. C. Schenck (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, American Phytopathological Society, St. Paul.
- Koske, R. E. y Gemma, J. N. (1989) 'A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas', *Mycological Research*, vol. 92, pp. 486–505.
- Koske, R. E. y Walker, C. (1985) 'Species of *Gigaspora* (Endogonaceae) with roughened outer walls', *Mycologia*, vol. 77, pp. 702–720.
- Mason, P. A., Musoko, M. O. y Last, F. T. (1992) 'Short-term changes in vesicular-arbuscular mycorrhizal spore populations in *Terminalia* plantations in Cameroon', in D. J. Read, D. H. Lewis, A. H. Fitter and I. J. Alexander (eds) *Mycorrhizas in Ecosystems*, CAB International Wallingford, pp. 261–267.
- Miller, D. D., Domoto, P. A. y Walker, C. (1985) 'Mycorrhizal fungi at eighteen apple rootstocks plantings in the United States', *New Phytologist*, vol. 100, pp. 379–391.
- Mosse, B., Stribley, D. P. y Le Tacon, E. (1981) 'Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi', *Advances in Microbial Ecology*, vol. 5, pp. 137–210.
- Moorman, T. y Reeves, F. B. (1979) 'The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid West, II: A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal populations', *American Journal of Botany*, vol. 66, pp. 14–18.
- Morton, J. B. y Benny, G. L. (1990) 'Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae', *Mycotaxon*, vol. 37, pp. 471–491.
- Morton, J. B. y Redecker, D. (2001) 'Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters', *Mycologia*, vol. 93, pp. 181–195.
- Morton, J. B., Bentivenga, S. P. y Bever, J. D. (1995) 'Discovery, measurement, and interpretation of diversity in arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes)', *Canadian Journal of Botany*, vol. 73 (suppl. 1), pp. S25–S32.
- Oehl, F. y Sieverding E. (2004) '*Pacispora*, a new vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes', *Journal of Applied Botany*, vol. 78, pp. 72–82.
- Philips, J. M. y Hayman, D. S. (1970) 'Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection', *Transactions of the British mycological Society*, vol. 55, pp. 158–161.

- Picone, C. (2000) 'Diversity and abundance of arbuscular-mycorrhizal fungus spores in tropical forest and pasture', *Biotropica*, vol. 32, pp. 734–750.
- Porter, W. M. (1979) 'Most Probable Number method for enumerating infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil', *Australian Journal of Soil Research*, vol. 17, pp. 515–519.
- Redecker, D., Morton, J. B. y Bruns, T. D. (2000) 'Molecular phylogeny of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus sinuosum* and *Sclerocystis coremioides*', *Mycologia*, vol. 92, pp. 282–285.
- Schenck, N. C. y Pérez, Y. (1990) *Manual for Identification of VA Mycorrhizal Fungi*, 3rd Edition, Synergistic Publications, Gainesville, USA.
- Schübler, A., Schwarzott, D. y Walker, C. (2001) 'A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution', *Mycological Research*, vol. 105, pp. 1413–1421.
- Spain, J.L., Sieverding, E. y Oehl, F. 2006. Appendicispora: a new genus in the arbuscular micorrhiza-forming Glomeromycetes, with a discussion of the genus *Archaeospora*. *Mycotaxon* vol 97, pp. 163-182.
- Stutz, J. C. y Morton, J. B. (1996) 'Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems', *Canadian Journal of Botany*, vol. 74, pp. 1883–1889.
- Trappe, J. M. (1982) 'Synoptic key to the genera and species of Zygomycetous mycorrhizal fungi', *Phytopathology*, vol. 72, pp. 1102–1108.

APÉNDICE 7.1. Especies de HMA de la familia Glomeraceae, género *Glomus*

Género/Especies	
<i>Glomus</i>	
<i>G. aggregatum</i> Schenck y Smith	<i>G. invermaium</i> Hall
<i>G. albidum</i> Walker y Rhodes	<i>G. laccatum</i> Blaszkowski
<i>G. ambisporum</i> Smith y Schenck	<i>G. lacteum</i> Rose y Trappe
<i>G. antarcticum</i> Cabello	<i>G. liquidambaris</i> (Wu y Chen) Almeida y Schenck
<i>G. arborenses</i> McGee	<i>G. macrocarpum</i> Tulasne y Tulasne
<i>G. aurantium</i> Blaszkowski, Blanke, Renker y Buscot	<i>G. maculosum</i> Miller y Walker
<i>G. australe</i> (Berkeley) Berch	<i>G. magnicaule</i> Hall
<i>G. boreale</i> (Thaxter) Trappe y Gerd.	<i>G. manihotis</i> Howeler, Sieverding y Schenck
<i>G. botryoides</i> Rothwell y Victor	<i>G. melanosporum</i> Gerd. y Trappe
<i>G. caledonium</i> (Nicol. y Gerd.) Trappe y Gerd.	<i>G. microaggregatum</i> Koske, Gemma y Olexia
<i>G. callosum</i> Sieverding	<i>G. microcarpum</i> Tulasne y Tulasne
<i>G. canadense</i> (Thaxter) Trappe y Gerd.	<i>G. minutum</i> Blaszk., Tadych y Madej
<i>G. cerebriforme</i> McGee	<i>G. monosporum</i> Gerdemann y Trappe
<i>G. citricola</i> Tang y Zang	<i>G. mertonii</i> Bentivenga y Hetrick
<i>G. clarioideum</i> Schenck y Smith	<i>G. mosseae</i> (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe
<i>G. clarum</i> Nicol. y Schenck	<i>G. multicaule</i> Gerd. y Bakshi
<i>G. clavisporum</i> (Trappe) Almeida y Schenck	<i>G. multisubstansum</i> Mukerji, Bhattacharjee y Tewari
<i>G. constrictum</i> Trappe	<i>G. nanolumen</i> Koske y Gemma
<i>G. convolutum</i> Gerd. y Trappe	<i>G. pallidum</i> Hall
<i>G. coremioides</i> (Berk. y Broome) Redecker y Morton	<i>G. pansihalos</i> Berch y Koske
<i>G. coronatum</i> Giovannetti	<i>G. proliferum</i> Dalpe y Declerck
<i>G. corymbiforme</i> Blaszkowski	<i>G. przelewicensis</i> Blaszkowski
<i>G. delhiense</i> Mukerji, Bhattacharjee y Tewari	<i>G. pubescens</i> (Sacc. y Ellis) Trappe y Gerdemann

APÉNDICE 7.1. *Continúa*

Género/Especies	
<i>G. deserticola</i> Trappe, Bloss y Menge	<i>G. pulvinatum</i> (Henn.) Trappe y Gerdemann
<i>G. diaphanum</i> Morton y Walker	<i>G. pustulatum</i> Koske, Friese, Walker y Dalpe
<i>G. dimorphicum</i> Boyetchko y Tewari	<i>G. radiatum</i> (Thaxter) Trappe y Gerd.
<i>G. dominikii</i> Blaszkowski	<i>G. reticulatum</i> Bhattacharjee y Mukerji
<i>G. etunicatum</i> Becker y Gerdemann	<i>G. rubiforme</i> (Gerd. y Trappe) Almeida y Schenck
<i>G. fasciculatum</i> (Thaxter) Gerd. y Trappe emend. Walker y Koske	<i>G. segmentatum</i> Trappe, Spooner y Ivory
<i>G. flavisporum</i> (Lange y Lund) Trappe y Gerd.	<i>G. sinuosum</i> (Gerd. y Bakshi) Almeida y Schenck
<i>G. formosanum</i> Wu y Chen	<i>G. sterilum</i> Mehrotra y Baijal
<i>G. fragile</i> (Berk. y Broome) Trappe y Gerd.	<i>G. taiwananse</i> (Wu y Chen) Almeida y Schenck
<i>G. fragilistratum</i> Skou y Jakobsen	<i>G. tenebrosum</i> (Thaxter) Berch
<i>G. fuegianum</i> (Spegazzini) Trappe y Gerdemann	<i>G. tenerum</i> Tandy emend. McGee
<i>G. fulvum</i> (Berk. y Broome) Trappe y Gerd.	<i>G. tenue</i> (Greenhall) Hall
<i>G. geosporum</i> (Nicol. y Gerd.) Walker	<i>G. tortuosum</i> Schenck y Smith
<i>G. globiferum</i> Koske y Walker	<i>G. trimurales</i> Koske y Halvorson
<i>G. glomerulatum</i> Sieverding	<i>G. tubiforme</i> Tandy
<i>G. halonatatum</i> Rose y Trappe	<i>G. versiforme</i> (Karsten) Berch
<i>G. heterosporum</i> Smith y Schenck	<i>G. vesiculiferum</i> (Thaxter) Gerd. y Trappe
<i>G. hoi</i> Berch y Trappe	<i>G. viscosum</i> Nicol.
<i>G. insculptum</i> Blaszkowski	<i>G. xanthium</i> Blaszk., Blanke, Renker y Buscot
<i>G. intraradices</i> Schenck y Smith	<i>G. warcupii</i> McGee

Fuente: tomado de <http://invam.caf.wvu.edu>.

APÉNDICE 7.2. Especies de HMA de la familia Acaulosporaceae, géneros *Acaulospora* y *Entrophospora*

Género /Especies	
<i>Acaulospora</i>	
<i>A. bireticulata</i> Rothwell y Trappe	<i>A. polonica</i> Blaszkowski
<i>A. capsicula</i> Blaszkowski	<i>A. rehmi</i> Sieverding y Toro
<i>A. cavernata</i> Blaszkowski	<i>A. rugosa</i> Morton
<i>A. delicata</i> Walker, Pfeiffer y Bloss	<i>A. scrobiculata</i> Trappe
<i>A. denticulata</i> Sieverding y Toro	<i>A. spinosa</i> Walker y Trappe
<i>A. dilatata</i> Morton	<i>A. splendida</i> Sieverding, Chaverri y Rojas
<i>A. elegans</i> Trappe y Gerdemann	<i>A. sporocarpia</i> Berch
<i>A. excavata</i> Ingleby y Walker	<i>A. taiwania</i> Hu
<i>A. foveata</i> Trappe y Janos	<i>A. thomii</i> Blaszkowski
<i>A. gedanensis</i> Blaszkowski	<i>A. tuberculata</i> Janos y Trappe
<i>A. koskei</i> Blaszkowski	<i>A. undulata</i> Sieverding
<i>A. lacunosa</i> Morton	<i>A. walkeri</i> Kramadibrata y Hedger
<i>A. laevis</i> Gerdemann y Trappe	<i>Entrophospora</i>
<i>A. longula</i> Spain y Schenck	<i>E. baltica</i> Blaszkowski
<i>A. mellea</i> Spain y Schenck	<i>E. colombiana</i> Spain y Schenck
<i>A. morrowiae</i> Spain y Schenck	<i>E. infrequens</i> (Hall) Ames y Schneider4
<i>A. myriocarpa</i> Spain, Sieverding y Schenck	<i>E. kentinensis</i> Wu y Liu
<i>A. nicolsonii</i> Walker, Reed y Sanders	<i>E. schenckii</i> Sieverding y Toro
<i>A. paulineae</i> Blaszkowski	

Fuente: tomado de <http://invam.caf.wvu.edu>.

**APÉNDICE 7.3. Especies de HMA de las familias
Archaeosporaceae (Género *Archaeospora*), Paraglomeraceae (Género
Paraglomus) y Pacisporaceae (Género *Pacispora*)**

Género /Especies
<i>Archaeospora</i>
<i>Ar. trappei</i> (Ames y Linderman) Morton y Redecker
<i>Ar. gerdemannii</i> (Rose, Daniels y Trappe) Morton y Redecker
<i>Ar. leptoticha</i> (Schenck y Smith) Morton y Redecker
<i>Paraglomus</i>
<i>P. brasilianum</i> (Spain y Miranda) Morton y Redecker
<i>P. occultum</i> (Walker) Morton y Redecker
<i>Pacispora</i>
<i>P. boliviana</i> Sieverd. y Oehl
<i>P. chimonobambusae</i> Blaszk. emend. Sieverd. y Oehl
<i>P. coralloidea</i> Sieverd. y Oehl
<i>P. dominikii</i> Sieverd. y Oehl
<i>P. franciscana</i> Sieverd. y Oehl
<i>P. robigina</i> Sieverd. y Oehl
<i>P. scintillans</i> Rose y Trappe emend. Sieverd. y Oehl

Fuente: tomado de Oehl y Sieverding, 2004 y <http://invam.caf.wvu.edu>.

APÉNDICE 7.4. Especies de HMA de la familia Gigasporaceae, géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*

Género /Especies
<i>Gigaspora</i>
<i>Gi. albida</i> Schenck y Smith
<i>Gi. decipiens</i> Hall y Abbott
<i>Gi. gigantea</i> (Nicol. y Gerd.) Gerd. y Trappe
<i>Gi. margarita</i> Becker y Hall
<i>Gi. rosea</i> Nicol. y Schenck
<i>Scutellospora</i>
<i>S. alborosea</i> (Ferr. y Herr.) Walker y Sanders
<i>S. arenicola</i> Koske y Halvorson
<i>S. armeniaca</i> Blaszkowski
<i>S. aurigloba</i> (Hall) Walker y Sanders
<i>S. biornata</i> Spain, Sieverding y Toro
<i>S. calospora</i> (Nicol. y Gerd.) Walker y Sanders
<i>S. castanea</i> Walker
<i>S. cerradensis</i> Spain y Miranda
<i>S. coralloidea</i> (Trappe, Gerd. y Ho) Walker y Sanders
<i>S. dipapillosa</i> (Walker y Koske) Walker y Sanders
<i>S. dipurpurascens</i> Morton y Koske
<i>S. erythroa</i> (Koske y Walker) Walker y Sanders
<i>S. fulgida</i> Koske y Walker
<i>S. gilmorei</i> (Trappe y Herd.) Walker y Sanders
<i>S. gregaria</i> (Schenck y Nicol.) Walker y Sanders
<i>S. hawaiiensis</i> Koske y Gemma
<i>S. heterogama</i> (Nicol. y Gerdemann) Walker y Sanders
<i>S. minuta</i> (Ferr. y Herr.) Walker y Sanders
<i>S. nigra</i> (Redhead) Walker y Sanders
<i>S. nodosa</i> Blaszkowski
<i>S. pellucida</i> (Nicol. y Schenck) Walker y Sanders
<i>S. persica</i> (Koske y Walker) Walker y Sanders
<i>S. reticulata</i> (Koske, Miller y Walker) Walker y Sanders
<i>S. savannicola</i> (Ferr. y Herr.) Walker y Sanders

APÉNDICE 7.4. *Continúa*

Género /Especies
<i>S. scutata</i> Walker y Diederichs
<i>S. spinosissima</i> Walker, Cuenca y Sanchez
<i>S. tricalypta</i> (Herr. y Ferr.) Walker y Sanders
<i>S. verrucosa</i> (Koske y Walker) Walker y Sanders
<i>S. weresubiae</i> Koske y Walker

Fuente: tomado de <http://invam.caf.wvu.edu>.

CAPÍTULO 8

Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas

Ludwig H. Pfenning y Lucas Magalhães de Abreu

INTRODUCCIÓN

Los hongos del suelo juegan un papel clave en los procesos de descomposición que mineralizan y reciclan nutrientes de plantas. En el suelo, los hongos interactúan con una compleja comunidad microbiana que incluye: bacterias, actinomicetos (actinobacterias) y pequeños invertebrados. Los hongos son una parte importante de la cadena alimenticia en el suelo, principalmente para la mesofauna que habita en el suelo (Bonkowski *et al.*, 2000). En los ecosistemas agrícolas, los patógenos de plantas actúan en el suelo y en la rizósfera, causando una notable reducción en las cosechas y afectando su calidad. (Wainwright, 1988; Lodge, 1993).

Para poder obtener una evaluación confiable de la diversidad de los hongos del suelo, existen dos condiciones básicas. Las investigaciones deben ser diseñadas en forma de estudios a largo plazo donde intervengan especialistas en taxonomía y micología, junto con una metodología precisa. Cuando un estudio de largo plazo involucra varios especialistas no resulta viable, debido al tiempo y la limitación de los recursos. El uso de organismos indicadores, grupos específicos o un conjunto de predictores, podrían ser una alternativa (Hyde, 1997a y b).

Las actividades agrícolas pueden afectar la diversidad de organismos presentes en el suelo, los cuales juegan un importante papel en el reciclaje de nutrientes o son mediadores del equilibrio entre los patógenos y sus antagonistas. La evaluación de la diversidad de hongos en suelos tropicales bajo diferentes usos de suelo es, por lo

tanto, un objetivo del proyecto CSM-BGBD. Los métodos estándares aceptados para inventariar la diversidad de hongos o para evaluar su impacto en varias prácticas agrícolas u otras actividades humanas, aún no están disponibles.

Los procedimientos clásicos microbiológicos para estudiar los hongos del suelo se basan en cultivos que implican el aislamiento de propágulos microbianos o hifas activas que crecen en el suelo, y su crecimiento en un medio de cultivo axénico para su posterior identificación y cuantificación. Los métodos utilizados para el aislamiento del suelo, rizósfera y hongos rizoplanos, han sido revisados por varios autores (Frankland *et al.*, 1990; Gray, 1990; Gams, 1992; Singleton *et al.*, 1992; Cannon, 1996; Davet y Rouxel, 2000; Bills *et al.*, 2004). Una visión global de los métodos para estudiar hongos patógenos de plantas en el suelo fue descrita por Singleton *et al.*, (1992). Se ha progresado considerablemente utilizando técnicas de lavado, medios de cultivo parcialmente selectivos y adictivos que reducen el crecimiento de ciertos grupos de hongos.

Las metodologías para aislar y cultivar hongos de ecosistemas complejos, tales como suelos que muestran limitaciones inherentes debido a la naturaleza de las especies y la inhabilidad de los medios de cultivo para copiar con exactitud los hábitats del suelo (Tsao *et al.*, 1983; Muyzer *et al.*, 1993; Bridge y Spooner, 2001). Incluso el análisis de abundancia relativa de especies cultivables recuperadas del suelo, puede no ser representativo de la dinámica de las comunidades del suelo, debido a que los medios de cultivo imponen nuevas condiciones selectivas y pueden introducir un sesgo en los análisis (Liu *et al.*, 1997). Una medida confiable de las comunidades de hongos en el suelo sin prejuicios requiere del seguimiento de un laborioso programa de aislamientos sistemáticos, con diferentes medios de cultivos y estrategias de aislamiento, que cubran las diferentes idiosincrasias de la diversidad taxonómica y grupos fisiológicos de hongos presentes en los ecosistemas del suelo. No obstante, afirmaciones genéricas de que únicamente el 1% de los "microorganismos" del suelo son cultivables aumentan la dificultad y no tienen en cuenta la inmensa diversidad biológica que realmente representan dichos microorganismos (Rondon *et al.*, 2000). Dentro de este grupo se encuentran grupos filogenéticamente diversos, tales como fila de Eubacterias, junto con muchos grupos homogéneos como el *filum* Glomeromycota, un grupo monofilético de organismos de hongos obligados asociados a las raíces de las plantas (véase Capítulo 7). Sin embargo, la mayoría de los hongos que habitan en el suelo pueden ser considerados saprotróficos, por lo tanto, deben ser capaces de crecer en cultivos axénicos.

Otras metodologías que han sido desarrolladas se enfocan en el análisis de la actividad de los hongos y su papel en los procesos biogeoquímicos que ocurren en el suelo. Con estos fines, se han aplicado métodos que dependen del análisis de la biomasa microbiana del suelo, respiración del suelo, reciclaje de nitrógeno y contenido de ácidos grasos del hongo o de observaciones directas del crecimiento del micelio en partículas de suelo (Widden y Parkinson, 1973; Houston *et al.*, 1998; Brodie *et al.*, 2003; Malosso *et al.*, 2006). No obstante, estos métodos proporcionan, por sí solos, poca información acerca de las especies de hongos involucrados en dichos procesos, por lo tanto, para un mejor entendimiento de la estructura y función de las comunidades de hongos del suelo, se requieren los procesos de aislamiento e identificación tradicionales (Brodie *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos de un estudio de hongos del suelo dependen, principalmente, de los métodos utilizados. En general, cada método presenta ciertas preferencias a ciertos grupos específicos de hongos; además, se deberá tomar en cuenta que el suelo no es un sustrato, sino un ecosistema compuesto por una mezcla de sustratos más diversos que incluyen partes de las plantas vivas y muertas, animales y otros microorganismos, junto con minerales y agua. Por ello, es necesario adoptar métodos similares dentro de los proyectos cooperativos o multidisciplinarios para garantizar la comparación de los datos en un futuro. En este capítulo se hace referencia a algunos de los métodos más comunes y también a algunas técnicas menos conocidas para la evaluación y monitoreo de comunidades de hongos del suelo. También son tomados en cuenta los principios y aplicaciones de herramientas moleculares en los estudios de comunidades de hongos del suelo. Aunque este enfoque no es exhaustivo, intenta ofrecer una visión global de los procedimientos disponibles. El objetivo principal es contribuir al establecimiento de una serie de métodos estándares, generalmente aceptados.

LA IMPORTANCIA ECOLÓGICA DE LOS HONGOS DEL SUELO

El suelo es un hábitat o ecosistema, y no un sustrato; esta característica complica las definiciones y la metodología, porque el suelo representa una mezcla compleja de fracciones orgánicas e inorgánicas con agua y organismos vivos. Las fracciones orgánicas se componen de material de plantas en diferentes fases de descomposición, raíces vivas, exudados, microorganismos, pequeños invertebrados y contenidos intestinales. Por esta razón, el suelo alberga una parte considerable de la biodiversidad total de hongos, y no existe ninguna estima-

ción fidedigna del número de especies de hongos del suelo (Hawksworth, 1991; Hawksworth y Rossman, 1997).

Los hongos del suelo juegan un papel clave en los procesos de descomposición, mineralizando y reciclando los nutrientes de las plantas (Wainwright, 1988; Lodge, 1993; Beare *et al.*, 1997). Los saprófitos tienen una especificidad limitada por sustratos; por ejemplo, los zygomycetes usan carbohidratos simples, mientras los *ascomyces* descomponen principalmente celulosa y hemicelulosa (Domsch *et al.*, 2007; Zak y Visser, 1996; Lodge, 1997). En sistemas agrícolas, los patógenos de plantas y sus antagonistas son particularmente importantes. Los patógenos de plantas actúan en el suelo, en la rizósfera o infectan tallos, causando que las plántulas se marchiten y, por tanto, provocan grandes pérdidas. Éstos pueden ser específicos, aunque la mayoría ataca una amplia gama de plantas hospederas. Existen evidencias de que las prácticas agrícolas causan más alteraciones cuantitativas que cualitativas en la comunidad de microhongos del suelo (Pfenning, 1997; Rodrigues-Guzman, 2001). La supresión de patógenos de plantas puede resultar intrínseca en los suelos, pero también es posible que se mantenga o incremente con algunas prácticas agrícolas específicas, tales como la incorporación de materia orgánica, plantas utilizadas como cubierta vegetal y la diversificación de cultivos. Algunos elementos biológicos han sido identificados como los principales factores de la supresión de enfermedades (Chet y Baker, 1980; Schneider, 1984; Mazzola, 2002, 2004). Se ha demostrado experimentalmente que la introducción de antagonistas específicos como *Trichoderma* spp. o *Coniothyrium minitans* pueden reducir la incidencia de una variedad de enfermedades en el suelo (Whipps *et al.*, 1993).

Con relación al papel de los organismos descomponedores, cabe mencionar que los hongos son responsables de la degradación de xenobióticos y contaminantes orgánicos introducidos en el suelo (Bordjiba *et al.*, 2001; Barratt *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). Los hongos también constituyen una parte importante de la cadena alimenticia dentro del suelo, especialmente en el caso de la mesofauna (Bonkowski *et al.*, 2000). El mantenimiento de la diversidad de hongos del suelo debería, por ende, beneficiar directamente la agricultura sustentable, mediante el suministro de nutrientes, una mejor estructura física del suelo y el control de antagonistas de los patógenos de las plantas en el suelo.

ASPECTOS DE SISTEMÁTICA MODERNA

Protozoa

Los organismos conocidos como hongos actualmente se agrupan en tres reinos, con un sistema de clasificación filogenético (Kirk *et al.*, 2001). Los hongos del reino Protozoa no son numerosos, aunque algunos de ellos son importantes patógenos de las plantas del suelo, tales como *Spongospora subterranea*, *Plasmodiophora brassicae* o *Polymyxa graminis*. Estas especies se clasifican en la clase Plasmodiophoromycetes. La detección de estos organismos requiere de bioensayos o cebos. Los hongos llamados mohos mucosos -un grupo de organismos heterogéneos y polifilético- habitan en restos de plantas, aunque también pueden encontrarse en el suelo.

Chromista

Los hongos que son derivados de algas y que contienen celulosa como el mayor componente en su pared celular pertenecen al reino Chromista Filum Oomycota (Dick, 2001; Kirk *et al.*, 2001). A pesar de que estos hongos representan un grupo delimitado de acuerdo con sus características y filogenia, su hábitat e importancia ecológica son variables. Mientras que algunos son verdaderos hongos acuáticos asociados con restos de plantas en agua o con patógenos de otros organismos acuáticos, otros habitan en el suelo. Dentro del grupo de los Oomycetes del suelo es posible encontrar saprófitos, así como otros géneros patógenos de plantas. Por sus características biológicas requieren de técnicas específicas para su aislamiento y caracterización, las cuales se presentan en la sesión "Procedimientos basados en cultivos".

Glomeromycota

Los hongos clasificados en el reino Fungi se caracterizan por tener quitina como el mayor componente en su pared celular. Dentro de este reino se reconocen cinco fila: los géneros que pertenecen al filum Glomeromycota forman micorrizas arbusculares y no crecen en ausencia de su planta hospedera (Schußler *et al.*, 2001; Moreira y Siqueira, 2002). Trabajar con este grupo de simbiontes biotróficos obligados requiere del uso de diferentes técnicas específicas, como se discutió en el Capítulo 7.

Chytridiomycota

El único grupo dentro del reino de los hongos que forma esporas flageladas es el filum Chytridiomycota; algunos de estos hongos habitan en el suelo, pero normalmente son acuáticos y viven como saprófitos o parásitos de otros organismos como nematodos, insectos, plantas u otros hongos. Varias de estas especies se conocen como transmisores de virus patógenos de plantas (Krik *et al.*, 2008).

Zygomycota

Representan el filum Zygomycota y se consideran como hongos de azúcar por su preferencia por carbohidratos simples y por su crecimiento vigoroso en un cultivo axénico. Especies de los géneros *Absidia*, *Cunninghamella*, *Gongronella*, *Mucor*, *Mortierella* o *Rhizopus* son muy comunes en el suelo y se encuentran en casi todos los estudios de hongos de suelo.

Basidiomycota

El filum Basidiomycota se caracteriza por el basidium, un meiosporangio en el que generalmente se forman cuatro esporas sexuales (Bauer *et al.*, 2006) y en la mayoría de los casos por la formación de un cuerpo fructífero. El micelio vegetativo se desarrolla, por lo general, en el suelo y en restos de plantas. Muchos de ellos forman ectomicorizas en asociación con el sistema de raíces de árboles forestales. La evaluación de la diversidad de estos hongos y el monitoreo de su impacto en la comunidad requieren de técnicas específicas (Rossman *et al.*, 1998) que no son consideradas en este manual. Los patógenos de plantas importantes en el suelo son especies de *Rhizoctonia* y *Sclerotium*.

Ascomycota

El filum Ascomycota representa el grupo más abundante de hongos. Se caracterizan por la formación de las ascas, una estructura formada durante la fase sexual de su ciclo de vida. La fase asexual de los ascomycetes se llama anamórfica y es la fase más comúnmente encontrada. La filogenia de este grupo aún es objeto de discusión y de revisión. Para fines prácticos, distinguir los grupos más importantes, tales

como plectomycetes, discomycetes, pyrenomycetes y loculoascomycetes puede ser útil. Algunos de los ascomycetes como *Aspergillus* y *Penicillium* que habitan en el suelo, pertenecen a los plectomycetes, ascomycetes que forman un asca en un cuerpo fructífero cleistotecal. Probablemente, el grupo más grande de hongos encontrados en el suelo son los pyrenomycetes anamorfos (Krik *et al.*, 2008).

MUESTREO DE SUELO

Utilizando un nucleador se extraen pequeñas cantidades de suelo, a una profundidad de 20 cm en 12 puntos distribuidos en cada parcela de muestreo de acuerdo con el esquema mostrado en el Capítulo 2. Cada juego de 12 muestras se homogenizan para formar una muestra compuesta de alrededor de 500 g que se coloca en una bolsa de plástico. De manera alternativa, si los recursos lo permiten, tres o más muestras compuestas podrán colectarse en cada punto de muestreo. Todos los materiales de muestreo (nucleador, espátula, azadón, etc.) deberán lavarse antes y después de tomar las muestras, con el fin de evitar la contaminación entre puntos de muestreo. La hojarasca deberá ser removida justo antes de extraer la muestra. Para la extracción del DNA, las muestras del suelo deberán trasladarse al laboratorio utilizando un recipiente con aislamiento, preferentemente a 4°C y congelarse lo más pronto posible para su futuro procesamiento. También se recogerá una segunda muestra compuesta de alrededor de 200 g, en caso de que se haya previsto realizar otros análisis físicos y químicos del suelo.

EVALUACIÓN DE LOS HONGOS DEL SUELO: PROCEDIMIENTOS BASADOS EN CULTIVOS

Todos los métodos propuestos dependen de muestras del suelo y no contemplan el uso de raíces para aislar hongos del suelo, debido a que la micobiota de la rizósfera es altamente influenciada por las especies de plantas. La rizósfera también contiene una alta concentración de bacterias que, a pesar del uso de antibióticos en los medios de cultivo, pueden resultar contraproducentes para la recuperación de especies de hongos. Debido a su pequeño tamaño y estructura poco diferenciada, la detección y el monitoreo de los hongos de organismos protistas como *Spongospora* y *Plasmodiophora* puede llevarse a cabo mediante bioensayos, utilizando plantas altamente susceptibles.

Oomycota: uso de cebos para el aislamiento de *Pythium* y *Phytophthora*

Para poder recuperar del suelo los oomicetes es aconsejable el uso de plantas susceptibles o tejidos vegetales. Especies de *Pythium* y *Phytophthora* pueden causar serios daños a plantas cultivadas. Alícuotas de 2 g de suelo se traspasan a cajas Petri que contienen agua estéril destilada. Se añaden granos de sorgo como cebo y se incuban por cinco días; después se comprueba la presencia de micelio en el cebo. Este procedimiento deberá continuarse durante varias semanas. El micelio del hongo formado en el sustrato deberá traspasarse a charolas con el medio MP5 (en el caso de Saprolegniaceae) y agar con harina de maíz (AHM), agar dextrosa y papa (ADP) o agar de papa y zanahoria (en el caso de Pythiaceae) (véase Apéndice 8.1 para la composición del medio). Después de incubar durante tres a cinco días, las porciones de agar que contengan micelio serán transferidas a placas con agua estéril destilada y con dos mitades de semillas de sorgo. Al final de dicho procedimiento se deberá observar que se obtiene únicamente un aislamiento para cada placa. El aislamiento de hongos zoospóricos (Oomycetes, Chytridiomycetes) de muestras ambientales aparece en la ilustración 6, en la sección de color de este manual. La ilustración A) representa una muestra de suelo con cebo; la B) una muestra de agua con cebo; la C) muestra un cultivo puro en el cebo y en la D) se observa el esporangio de *Phytophthora*, mientras que el oogonio y anteridio de *Pythium* se ilustran en E); finalmente, en la última ilustración F), se observa la liberación de zoosporas de *Pythium*.

Otra técnica con sustrato susceptible utiliza muestras de suelo húmedo de 0.5 g colocadas en tubos de ensayo de vidrio esterilizado con 3 ml de agua estéril. Se esterilizan en autoclave fragmentos de hojas de zacate y se añaden a los tubos como tejidos para recuperar el *Pythium* spp. Las muestras son incubadas durante tres a cinco días a 25°C en la oscuridad. Los tejidos infectados deben transferirse en agua estéril con el antibiótico cloranfenicol durante unas horas. El micelio en crecimiento se verifica directamente mediante montajes con agua en un microscopio o se transfiere del cebo al medio de aislamiento (AHM) que contiene cloranfenicol (50 mg L⁻¹) y benomil (10 mg L⁻¹) (Marks y Mitchell, 1970; Tsao *et al.*, 1983; Gams *et al.*, 1998; Edena *et al.*, 2000). Pueden llevarse a cabo ensayos cuantitativos utilizando la frecuencia de la colonización relativa de los tejidos del cebo entre las réplicas de cada muestra de suelo. Las hojas de zacate como cebo pueden ser sustituidas por pedazos de frutas o verduras como pepino, tomate o papa.

Uso de cebos para el aislamiento de Chytridiomycota

Para evaluar los Chytridiomycota se usan las mismas técnicas empleadas para los oomicetos. Como el aislamiento de colonias individuales en un medio de cultivo axénico es difícil, la caracterización e identificación se hace directamente en el cebo. Los cebos más apropiados incluyen cáscara de camarón, piel de serpiente, alas de insectos, y pedazos de frutas y verduras (Gams *et al.* 1998). Para su preservación, los cebos pueden transferirse a viales.

***Basidiomycota – Rhizoctonia*: técnica de cebo y aislamiento directo de partículas de suelo**

Para evaluar este género de basidiomicetes anamórficos del suelo, se describen varios métodos, compilados por Sneh *et al.*, (1991). Un método para evaluar la densidad de inóculo de *Rhizoctonia* spp. en suelos de jardines de eucalipto clonados fue descrito recientemente por Sanfuentes *et al.* (2002). A continuación, se presentan dos métodos de aislamiento útiles.

Método de partículas de suelo

Una suspensión de 10 g de muestra de suelo y agua de la llave es agitada, después decantada usando un tamiz de 0.5 mm. El suelo retenido se resuspende y se pasa varias veces por el tamiz. Las partículas de suelo retenidas se secan con papel absorbente estéril y se transfieren a una caja Petri de 15 cm de diámetro que contenga un medio de agar con agua acidificada (al 2%) con 250 mg L⁻¹ de cloranfenicol. Después de un periodo de incubación de 24 a 48 horas, a 25°C, se verifica el crecimiento típico de *Rhizoctonia*; se evalúa la frecuencia de la colonización en las partículas del suelo y el micelio se transfiere a ADP para su eventual caracterización (Sneh *et al.*, 1991).

Técnica de cebo

Se mezcla 1 g de semillas de betabel con 100 g de suelo húmedo en cajas Petri. Después de un periodo de incubación de 48 horas a 25°C, se recuperan las semillas con un tamiz de 1.5 mm; posteriormente, se lavan con agua destilada durante

20 minutos, se secan con papel absorbente estéril para ser transferidas a un medio de agar con agua al 2%, que contenga 100 mg L^{-1} de cloranfenicol. El crecimiento de *Rhizoctonia* se verifica y se transfiere micelio a ADP para su aislamiento y caracterización (Papavizas *et al.*, 1975).

A pesar del uso común de varios métodos para el aislamiento de *Rhizoctonia* de muestras de suelo agrícola, su aplicación en el estudio de suelos bajo vegetación natural, por el grupo de investigadores involucrados en el proyecto, ha mostrado severas limitaciones debido a la continua presencia de *Trichoderma* spp. en estos suelos. De esta manera, el empleo de técnicas de cultivo independiente, como la amplificación de DNA ribosomal de *Rhizoctonia* con iniciadores (en inglés, *primers*) específicos y su análisis cualitativo e incluso cuantitativo puede resultar idóneo bajo circunstancias específicas (Lees *et al.*, 2002).

Ascomycota: técnica de lavado del suelo y filtración de partículas

Éste es el mayor grupo de hongos del suelo que incluye especies saprófitas, entomopatógenas, fitopatógenas y sus antagonistas. Todas estas especies exhiben una fase saprotrófica en el suelo y pueden ser aisladas utilizando una metodología con placas de suelo. La técnica de lavado de suelo es un método adecuado para el aislamiento de estas especies.

Técnica de lavado

Una muestra de 10 g de suelo mineral se agita con 200 ml de agua destilada en una centrífuga a 180 rpm durante 10 minutos. Después de la sedimentación de las partículas del suelo durante 2 minutos, el sobrenadante se desecha y se repite el procedimiento dos veces. Las partículas de suelo prelavadas son filtradas, utilizando un juego de tamices de 1.0 mm, 0.7 mm, 0.5 mm y 0.21 mm usando agua destilada (alrededor de 2 litros) por 2 minutos. Los coloidales de suelo y granos de arena son removidos del último tamiz, secados con papel absorbente esterilizado y transferidos (7 partículas por placa) a 5 cajas Petri (90 mm) que contienen el medio de aislamiento AHM (30 g L^{-1}), más estreptomycin plus (50 mg L^{-1}) para la inhibición de bacterias y ciclosporina (10 mg L^{-1}) o rosa de Bengala (70 mg L^{-1}), para la inhibición de hongos de rápido crecimiento. La frecuencia de colonización de partículas de suelo para cada especie de hongos es utilizada en ensayos cuantitativos. Cuando se emplea ciclosporina se logra una supresión casi completa

de zygomycetes saprotróficos. Por lo tanto, cuando se trata de estudiar este último grupo de hongos, se debe evitar el uso de ciclosporina (Dhingra y Sinclair, 1985; Lang y Jagnow, 1986; Bååth, 1988; Gams, 1992; Bills y Polishook, 1994; Kacprzak y Stanczyk-Mazanek, 2003). Este método se puede observar en la ilustración 7.

El método de dilución del suelo en placa

Este es el método de uso más común para el aislamiento y estimación cuantitativa de bacterias y hongos. La técnica es muy simple y se han descrito varias modificaciones. Básicamente, una cantidad conocida de suelo es suspendida en agua estéril, se toma 10% de la suspensión, la cual se mantiene en agitación durante unos momentos. De esta suspensión se prepara una serie de 10 diluciones, hasta lograr la dilución final. Un factor final de dilución de 10^{-4} ó 10^{-5} se considera adecuado para el aislamiento de hongos (Dhingra y Sinclair, 1985). Las alícuotas de la dilución final son distribuidas en cajas Petri que contienen un medio de agar generalmente, modificado con antibióticos como cloranfenicol, estreptomina o penicilina para inhibir el crecimiento de bacterias. Se pueden lograr medidas cuantitativas multiplicando el promedio de las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas, por el factor de dilución empleado, el resultado es una estimación del número de propágulos de hongos por gramo de suelo (Bills *et al.*, 2004). Existe una preocupación generalizada porque el método de dilución en placas muestra un sesgo hacia los hongos que son capaces de producir grandes cantidades de esporas y que crecen muy rápido en un medio de cultivo rico. Por lo tanto, la diversidad de hongos que normalmente existen en forma de micelio que crece activamente en el suelo, y que tienen poca habilidad de competir con especies de rápido crecimiento en medios axénicos son subestimados por esta técnica (Bååth, 1988; Gams *et al.*, 1998; Tsao *et al.*, 1983).

Ascomycota: medios selectivos y técnica con cebo

Para un aislamiento selectivo de grupos blanco o especies de hongos del suelo, rutinariamente se utilizan medios selectivos; éstos pueden contener fuentes de carbono preferiblemente metabolizados por algunos grupos fisiológicos de hongos o pueden modificarse con químicos que inhiben el crecimiento de organismos no deseados. Un gran número de medios selectivos ha sido desarrollado para el aisla-

miento de varios géneros de ascomycetes, basidiomycetes y oomycetes del suelo, en particular, aquéllos que contienen especies patógenas de plantas, por ejemplo, para el aislamiento de *Rhizoctonia solani* se utiliza agua-agar acidificada, mientras que para *Fusarium* spp. el medio usado es Komada (Masago *et al.*, 1977; Tsao *et al.*, 1983; Dhingra y Sinclair, 1985; Sneh *et al.*, 1991; Thorn *et al.*, 1996; Edel *et al.*, 2001).

El aislamiento selectivo de los hongos del suelo también puede llevarse a cabo con cebos que son colonizados por grupos fisiológicos específicos de hongos. En la mayoría de los casos, el tejido cebo es incubado con una muestra de suelo durante unos días; después se transfiere a un medio selectivo de agar para su posterior aislamiento de los hongos deseados. La colonización del cebo por un hongo clave también puede llevarse a cabo mediante la observación directa al microscopio (Gams *et al.*, 1998). Ejemplos de cebos utilizados para el aislamiento selectivo de hongos del suelo son tejidos de plantas para el caso de patógenos de plantas; cabello para las especies queratinofílicas, quitina para los productores de quitinasa, larvas de insectos para los entomopatógenos y nematodos para los hongos nematófagos (Marks y Mitchell, 1970; Papavizas *et al.*, 1975; Dackman *et al.*, 1987; Sneh *et al.*, 1991; Gams *et al.*, 1998; Edena *et al.*, 2000; Gonçalves *et al.*, 2001; Pettitt *et al.*, 2002; Barratt *et al.*, 2003; Wellington *et al.*, 2003).

Procedimiento para el aislamiento para el aislamiento de *Cylindrocladium* y géneros afines del suelo, utilizando como cebo hojas de *Ricinus communis*

Cylindrocladium es un género conformado por especies saprotróficas y patógenas de plantas comúnmente encontradas en el suelo. A pesar de ello, especies de *Cylindrocladium* y de las especies relacionadas *Cylindrocladiella* y *Gliocladiospsis* raramente son reportadas en muestras de suelo que emplean el método de dilución del suelo por placas. Como el *Cylindrocladium* y probablemente otros géneros son sensibles a la ciclosporina, deberán aislarse selectivamente usando cebos; varios materiales de plantas adecuados para su aislamiento fueron descritos en una monografía reciente (Crous, 2002b). En el laboratorio se utilizan hojas de ricino (*Ricinus communis*) como cebo para el aislamiento de hongos del complejo *Cylindrocladium* de manera rutinaria, cuyo protocolo se describe a continuación.

Hojas jóvenes y frescas se recogen y se lavan bajo agua de la llave para posteriormente ser sometidas a una desinfección con etanol al 70% durante un minuto,

seguida de hipoclorito de sodio al 3%, durante dos minutos. Las hojas utilizadas sin desinfección previa tienden a ser degradadas con mayor rapidez y a ser colonizadas por bacterias. Las hojas enteras se colocan en una caja Petri de 15 cm y se cubren con una capa de suelo húmedo; después de tres días de incubación se lavan las hojas cuidadosamente con agua destilada y se transfieren a una cámara húmeda, donde diariamente se verifica la esporulación típica de *Cylindrocladium*, *Cylindrocladiella*, *Gliocladiospsis* y otros géneros relacionados. El aislamiento del hongo se logra con la transferencia de esporas a un medio de cultivo, utilizando agujas finas de cristal, bajo un microscopio estereoscópico (Gams *et al.*, 1998; Gonçalves *et al.*, 2001; Crous, 2002b).

Técnica de cebo para el aislamiento de patógenos fúngicos de plántulas

Una amplia gama de hongos patógenos de plantas en el suelo puede causar la muerte prematura de las plántulas; por lo tanto, es recomendable para su aislamiento el uso de plántulas de tomate como cebo. Las semillas de tomate se germinan en 100 g de suelo y se verifica si las plántulas manifiestan o no, síntomas de podredumbre. Los tejidos de plántulas infectadas se esterilizan con hipoclorito de sodio (al 2%, durante 30 segundos), enseguida se lavan con agua destilada y se secan en papel absorbente esterilizado para ser transferidas a un medio de aislamiento, tal como ADP y AM (agar extracto de malta) que contiene cloranfenicol (250 mg L^{-1}).

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS DE SUELO

La identificación de hongos que habitan el suelo puede causar problemas para aquéllos que no tengan suficientes conocimientos de micología. Las dificultades de identificar a nivel de especie se ilustran con el género *Fusarium*, que es un grupo heterogéneo que incluye saprófitos, endófitos y patógenos de plantas. El trabajo de Barnett y Hunter (1998) es usado para unos pocos de los muchos saprófitos, incluyendo hongos del suelo. Después de más de 20 años, el amplio trabajo de Domsch *et al.* (2007) aún sigue siendo una fuente importante para todos los involucrados en el estudio de hongos del suelo. Además de las claves y monografías de alrededor de 250 géneros, este compendio contiene claves para especies de varios géneros importantes y una recopilación de la literatura.

Monografías y páginas *web* se encuentran disponibles para identificar las especies de *Aspergillus*, (Klich y Pitt 1988), *Cylindrocladium* (Crous, 2002b), *Fusarium* (Leslie *et al.*, 2006), *Penicillium* (Pitt, 2000), *Trichoderma* (Bissett, 1984, 1991a, b, c; Samuels *et al.*, (página web), hifas anamórficas pigmentadas (Ellis, 1971, 1976) y coelomycetes anamórficos (Sutton, 1980; Nag Raj, 1993). Si se trata de identificar ascomycetes, las monografías y claves de Hanlin (1990, 1998a, b) pueden ser un buen punto de partida. No son específicas para el caso de hongos del suelo; sin embargo, sí, de mucha utilidad para este tema otras recopilaciones y monografías como la de Ellis y Ellis (1985), Samson *et al.* (2000) o el manual de Gams *et al.*, (1998). Existen monografías disponibles para chytrids (Karling 1977) y también para el género *Pythium* (Waterhouse, 1967, 1968; van der Plaats-Niterink, 1981) y para *Phytophthora* (Waterhouse, 1970; Tsao *et al.*, 1983; Erwin y Ribeiro, 1996). La monografía de Sheh *et al.*, (1991) resulta útil para trabajar con *Rhizoctonia*. Para más instrucciones acerca de cómo identificar hongos o grupos específicos de hongos, se puede consultar el *Dictionary of the Fungi* (Kirk *et al.*, 2001). Una lista de referencias de guías y manuales para la identificación de grupos de hongos de suelo puede consultarse al final de este capítulo.

EVALUACIÓN DE HONGOS DEL SUELO: TÉCNICAS ESPECÍFICAS DE DNA

Una medida confiable de las comunidades de hongos del suelo, requiere de un laborioso programa de aislamientos sistemáticos con diferentes medios de cultivos y estrategias de aislamiento que reflejen la inmensa diversidad taxonómica y fisiológica de grupos de hongos que habitan en el suelo (Tsao *et al.*, 1983; Muyzer *et al.*, 1993; Bridge y Spooner, 2001; Bills *et al.*, 2004). No obstante, algunos tipos de hongos como Basidiomycota son difíciles de aislar y pueden no esporular en un medio axénico (Thorn *et al.*, 1996). Se pueden utilizar otras metodologías para complementar los enfoques tradicionales usados para un mejor entendimiento de la diversidad y dinámica de los hongos del suelo; éstos incluyen técnicas específicas de DNA. Las herramientas moleculares basadas en el análisis del DNA han sido aplicadas con éxito en el estudio de complejos bacterianos y, recientemente, en ensamblajes de hongos a partir de muestras ambientales. Las secuencias de DNA son amplificadas directamente desde el suelo por medio de la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR) y posteriormente caracterizadas utilizando varios enfoques (Bridge y Spooner, 2001).

Extracción de DNA

Un paso crucial antes del PCR, es la extracción del DNA directamente del suelo. Las células de los hongos presentes en la muestra del suelo, incluso como micelio o esporas, tienen que estar correctamente lisadas. Los protocolos de extracción se basan, principalmente, en los procesos físicos de macerado asociado con calor y lisis química. El total de DNA obtenido debe estar completamente purificado para eliminar sustancias húmicas y fenólicas que interfieren con el PCR; este paso se logra mediante separaciones a través de columnas de separación o con el uso de *kits* comerciales de purificación de DNA (Liu *et al.*, 1997; Viaud *et al.*, 2000; Bridge y Spooner, 2001). Los *kits* para la extracción de DNA del suelo están comercialmente disponibles. La heterogeneidad encontrada a nivel de micro-escala en el suelo debe ser considerada cuando se selecciona el tamaño de la muestra de suelo sometida a la extracción total de DNA. Las muestras muy pequeñas (menores a un gramo) deben usarse con precaución porque tienen mayor probabilidad de error, debido a una variabilidad más alta dentro de la muestra (Ranjard *et al.*, 2001).

Reacción en cadena de la polimerasa. Uso de *Primers* específicos para “hongos”

El grupo de genes para las moléculas de RNA Ribosomales 18S, 5.8S y 28S se considera que son altamente conservados entre los organismos eucarióticos y normalmente se emplean como marcadores moleculares. El polimorfismo en la longitud del DNA y la variación en la secuencia de las bases pueden utilizarse para agrupar organismos de acuerdo con su origen y relación evolutiva. La identificación de secuencias de DNA desconocidas también puede realizarse comparándolas con bases de datos de secuencias de nucleótidos de taxones conocidos. Varias copias del DNA ribosomal (rDNA) se encuentran en el genoma eucariota, facilitando la amplificación de pequeñas muestras de DNA. El rDNA también contiene espaciadores entre las regiones codificantes conocidos como espaciadores internos de transcripción (ITS) que presentan secuencias de bases menos conservadas y que pueden utilizarse para la diferenciación entre especies relacionadas o para evaluar

divergencias genéticas intraespecíficas (Viaud *et al.*, 2000; Baayen *et al.*, 2000; Down, 2002).

Como el suelo contiene un gran número de organismos, el obtener *Primers* o iniciadores de rDNA de hongos específicos constituye un paso fundamental en la amplificación del PCR. Los *Primers* permiten la amplificación de una amplia gama de especies de hongos sin perder la especificidad de este grupo clave. Basándose en las secuencias de genes de RNA ribosomal disponibles en bancos de datos especializados para varias especies de hongos, los *Primers* que son específicos para amplificar PCR del DNA de hongos de muestras complejas de suelo, han sido desarrollados y compilados por Anderson y Cairney (2004). Sin embargo, algunos de estos *Primers* específicos han mostrado que amplifican DNA no fúngico o muestran preferencia hacia la amplificación de grupos taxonómicos específicos dentro del reino de los hongos (Smit *et al.*, 1999; Borneman y Hartin, 2000; Anderson *et al.*, 2003).

La detección y/o cuantificación de pocas especies específicas de hongos es requerida generalmente en el campo de la fitopatología. Para este tipo de investigación se han desarrollado varios iniciadores especie-específicos para una detección directa y el monitoreo de patógenos de estas plantas a partir de muestras del suelo (Cullen *et al.*, 2002; Lees *et al.*, 2002; Fillion *et al.*, 2003). Algunos hongos que están presentes en muy bajas densidades en suelos naturales, tales como especies de *Phytophthora*, son difíciles de detectar por métodos moleculares, ya que el PCR tiende a amplificar moléculas del DNA que son dominantes en el extracto del DNA total. En el caso de estos hongos, la detección molecular de muestras de suelo puede ser mejorada mediante el uso de técnicas de cebo en conjunto con PCR, utilizando *Primers* específicos para Géneros y/o especies de interés (Nechwatal *et al.*, 2001).

Secuenciación del DNA

Para poder conocer las identidades del DNA de los hongos amplificados por PCR, los amplicones de tamaño correcto pueden separarse en geles de agarosa, extraídos de matrices de gel, purificados, conectados a vectores plásmidos y clonados en células bacterianas. El DNA clonado es secuenciado y comparado con las bases de datos que contienen secuencias oligonucleotídicas del rDNA fúngico mediante análisis de *software*. Estos procedimientos son caros, consumen tiempo y, además, no son adecuados para la evaluación de muestras ambientales complejas. Por

ello, se han desarrollado técnicas moleculares de huella o rastreo molecular (en inglés *fingerprint*) para estudiar la diversidad a nivel de comunidad (Borneman y Hartin, 2000; Viaud *et al.*, 2000; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003).

Método de huella molecular

TGGE y DGGE

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización fue introducida en estudios sobre ecología microbiana por Muyzer y Smalla (1998). En esta técnica, las moléculas 18S DNA amplificadas por PCR son sometidas a una electroforesis en una matriz de gel con un gradiente lineal térmico (TGGE) o con un gradiente desnaturalizante (DGGE). Los amplicones tienen exactamente el mismo número de nucleótidos, pero difieren en su contenido de *Guanina-Citosina* (GC), lo que determina el modo de desnaturalización y la movilidad electroforética al migrar en el gel desnaturalizante. Los iniciadores usados en el PCR, generalmente, contienen un DNA con bases repetitivas de GC que resultan menos propensas a la desnaturalización debido a su alta estabilidad química. El gradiente de desnaturalización en DGGE puede variar con el uso de diferentes cantidades de urea y de formamida en la matriz del gel. Los patrones de bandeo generados son utilizados para analizar complejas comunidades de hongos del suelo. Bajo estas condiciones de desnaturalización, el DNA se extiende a la misma longitud (como resultado del PCR), pero con diferentes secuencias de pares de bases, parcialmente desnaturalizadas debido a las diferencias de la desnaturalización de los dominios menos estables en las moléculas, y se llaman dominios de fusión. Por lo tanto, moléculas de DNA con diferentes secuencias en sus pares de bases, presentan diferentes comportamientos de desnaturalización y migran hacia diferentes puntos en el gel (Muyzer *et al.*, 1993). En varios estudios se ha usado esta técnica para evaluar la estructura de la comunidad de hongos y otros microorganismos, al igual que para monitorear modificaciones o impactos debidos a prácticas agrícolas o actividades industriales (Smit *et al.*, 1999; Elsas *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2003; Milling *et al.*, 2004). Las restricciones y limitaciones están representadas en la selección de *Primers* utilizados en el primer paso de amplificación después de la extracción total del DNA de las muestras. Varias combinaciones de *Primers* han sido propuestas para amplificar DNA de distintos grupos de hongos como Ascomycota, Basidiomycota,

Chytridiomycota, Zygomycota y Oomycota (Nikolcheva y Bärlocher, 2004). El uso de un PCR anidado puede arrojar aún mejores resultados e incrementar la resolución en la separación de los productos del PCR (Oros-Sichler *et al.*, 2006). Otra limitante es que el DNA obtenido de organismos filogenéticamente distantes puede producir productos de PCR con una movilidad electroforética idéntica (Gomes *et al.*, 2003). No obstante, la técnica puede proporcionar un estándar altamente reproducible de un gran número de muestras ambientales durante un periodo de tiempo relativamente corto. Recientemente, los enfoques polifásicos que incluyen la construcción de bibliotecas de fragmentos clonados, el método de huella molecular, los análisis bioquímicos y las técnicas de aislamiento, son la mejor opción (Malosso *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006).

Técnica PCR-RFLP

La escasa variabilidad de rDNA de hongos puede resultar desventajoso en la técnica de huella molecular, tales como TGGE y DGGE; por ejemplo, la comigración de diferentes moléculas de DNA hacia un mismo punto en el gel. Para incrementar el polimorfismo de la banda y mejorar la resolución, la restricción enzimática del DNA antes de la electroforesis puede utilizarse en una técnica conocida como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del DNA amplificado por PCR (Viaud *et al.*, 2000). Las especies de hongos relacionadas pueden identificarse de acuerdo con sus patrones típicos de RFLP, después de la amplificación del DNA por PCR directamente extraídos del suelo utilizando *Primers* género-específicos (Nechwatal *et al.*, 2001).

T-RFLP

Liu *et al.* (1997) desarrollaron una versión complementaria del PCR-RFLP, llamada polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal para el análisis (T-RFLP) de comunidades bacterianas de muestras ambientales. En el T-RFLP, el DNA es amplificado por PCR con uno de los dos *Primers* marcados con fluorescencia. Después de la amplificación, el DNA es tratado con enzimas de restricción y los fragmentos de restricción separados en un gel de acuerdo con su tamaño. Los fragmentos de restricción terminal (TRFs) se marcan con fluorescencia y pueden ser detectados y cuantificados en un secuenciador automático. Se puede construir una base de datos de TRFs a partir de especies de hongos conocidos y utilizarla en corre-

laciones taxonómicas con los haplotipos detectados en el análisis T-RFLP (Brodie *et al.*, 2003; Edel-Hermann *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006).

ARISA

El polimorfismo natural de la región ITS del rDNA entre especies de hongos puede utilizarse para la evaluación de comunidades de hongos de suelo. En el análisis automatizado del espaciador intergénico ribosomal (ARISA), el DNA fúngico es extraído del suelo y amplificado por PCR utilizando *Primers* específicos para la región ITS con uno de los *Primers* marcados con fluorescencia. Después de la amplificación, los diferentes fragmentos de ITS son separados en un gel y posteriormente detectados y cuantificados en un secuenciador automático (Ranjard *et al.*, 2001). El ARISA de hongos es una técnica altamente sensible; sin embargo, el polimorfismo intra-específico del ITS puede presentar problemas en la separación de distintas especies filogenéticas (O'Donnell y Cigelnik, 1997; Viaud *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2005).

SSCP

Otro estudio de huella molecular utiliza la migración diferencial de moléculas de una hebra de DNA en un gel para poder estudiar a las comunidades microbianas más complejas. En el polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP), el DNA amplificado es completamente desnaturalizado antes de ser sometido a una corrida de electroforesis. Las moléculas de una sola hebra de DNA adquieren estructuras con dobleces únicos dictados por sus secuencias nucleotídicas y migran hacia puntos específicos en el gel. Como consecuencia, los fragmentos de DNA del mismo largo, pero disímiles en su secuencia de pares de bases pueden ser fácilmente separados en SSCP por su diferencial de migración en el gel cuando existe la conformación de una sola hebra (Lee *et al.*, 1996; Lowell y Klein 2001; He *et al.*, 2005). La Tabla 8.1 muestra algunos ejemplos de técnicas moleculares empleadas para el estudio de comunidades de hongos del suelo publicadas en años recientes.

PCR cuantitativo

Algunos estudios, especialmente con hongos patógenos de plantas, están enfocados en una o en pocas especies de hongos presentes en el suelo. En estos es-

tudios, se deben diseñar *Primers* de PCR específicos para obtener la amplificación correcta del DNA de la especie clave y otros marcadores moleculares pueden ser empleados como secuencia del gen β -tubulina o el factor de elongación de traducción del gen EF 1- α (Baayen *et al.*, 2000; Mauchline *et al.*, 2002; Filion *et al.*, 2003; Li y Hartman, 2003). Además de la detección molecular, la cuantificación del DNA de hongos en el suelo es requerida frecuentemente para estudios epidemiológicos y ecológicos. No obstante, el PCR convencional es inapropiado para enfoques cuantitativos porque cualquier pequeña variación durante la fase exponencial en la reacción de amplificación puede alterar drásticamente las cantidades de los productos del PCR. En el caso de ensayos cuantitativos, han sido desarrolladas modificaciones del PCR convencional como PCR competitivo (cPCR) y PCR en tiempo real.

En el cPCR, fragmentos de DNA que contienen los mismos sitios iniciadores que la muestra de DNA son añadidos en cantidades conocidas a las reacciones del PCR y coamplificados con el DNA específico. Después de esta amplificación, los distintos productos de PCR son cuantificados por separado de acuerdo con sus intensidades de bandeo relativas en geles de agarosa. La cantidad de DNA en la muestra puede calcularse con la adición de diferentes cantidades de DNA competitivos, a una cantidad estándar de una muestra de DNA en una serie de PCRs y con el monitoreo de productos PCRs competitivos producidos en cada reacción (Siebert y Larrick, 1992; Baek y Kenerley, 1998; Mauchline *et al.*, 2002).

Otro método empleado en aproximaciones cuantitativas es el de PCR en tiempo real. Sondas fluorogénicas o colorantes adicionados al PCRs permiten el monitoreo correcto de los productos obtenidos durante la amplificación. Las sondas fluorescentes son capaces de emitir fluorescencia en la presencia de DNA de dos hebras; por lo tanto, el incremento de moléculas de DNA durante la amplificación conlleva un incremento en la intensidad de la emisión fluorescente, lo cual puede calibrarse y medirse con precisión. Una curva estándar puede construirse con cantidades conocidas de DNA e intensidades de fluorescentes. Después de un número definido de ciclos de PCR éstos se usan para cuantificar el DNA directamente de muestras de suelo. Esta técnica es más rápida y más sencilla que cPCR porque no existe la necesidad de construir un competidor de DNA y no se requiere de ningún análisis post-PCR (Cullen *et al.*, 2002; Lees *et al.*, 2002; Filion *et al.*, 2003).

Tabla 8.1 Resumen de los métodos que utilizan clonación de DNA y secuenciación para la identificación de los haplotipos dominantes, amplificados del DNA total.

Técnica*	Evaluación de comunidades de hongos en	Referencias
TGGE	Rizósfera y suelo compuesto con trigo.	Smit <i>et al.</i> , 1999
PCR-RFLP	Una muestra de suelo por métodos de cultivo y molecular.	Viaud <i>et al.</i> , 2000
SSCP	Suelo estepario con pasto corto con o sin presencia de nitrógeno.	Lowel y Klein, 2001
ARISA	Suelos con diferentes propiedades físicoquímicas.	Ranjard <i>et al.</i> , 2001
DGGE	Análisis de la dinámica de comunidades de hongos del suelo vía PCR hongo-específicos del DNA del suelo, seguido por DGGE.	Elsas <i>et al.</i> , 2000
DGGE	Gradiente de suelo desde llanuras hasta bosques de pino escocés.	Anderson <i>et al.</i> , 2003
DGGE y TRFLP	Gradiente de pastizales semi-naturales a suelos agrícolas mejorados.	Brodie <i>et al.</i> , 2003
DGGE y restricción de DNA amplificado	Rizósfera de dos cultivos de maíz durante el periodo de ciclo de vida de la planta.	Gomes <i>et al.</i> , 2003
DGGE	Diferentes horizontes de un suelo de selva.	Agnelli <i>et al.</i> , 2004
T-RFLP	Suelos con diferentes propiedades físicoquímicas; los efectos de cambiar el suelo al añadir composta o excremento.	Edel-Hermann <i>et al.</i> , 2004
DGGE	Suelos bajo cultivos de papa transgénica y no transgénica.	Milling <i>et al.</i> , 2004
SSCP y TGGE	Suelos de bosque natural y plantaciones de pino hoop.	He <i>et al.</i> , 2005
ARISA y T-RFLP	Pastizales bajo diferentes tipos de vegetación.	Kennedy <i>et al.</i> , 2005
DGGE con iniciadores específicos para <i>Fusarium</i>	Campos de espárragos; análisis de detección y diversidad de especies de <i>Fusarium</i> .	Yergeau <i>et al.</i> , 2005
DGGE y T-RFLP	Tres diferentes suelos cultivados con <i>Lolium perenne</i> .	Singh <i>et al.</i> , 2006

Tabla 8.1 *Continúa.*

Técnica*	Evaluación de comunidades de hongos en	Referencias
DGGE y ARDRA	Diversidad de hongos en suelos antárticos que combinan cultivo de aislamiento, huella molecular y técnicas de clonación.	Malosso <i>et al.</i> , 2006

Nota: * la clonación del DNA y la secuenciación fueron usadas por todos los autores para la identificación de haplotipos dominantes amplificados del DNA total, por lo tanto, este método no se describe para cada ejemplo.

CONCLUSIONES

Las herramientas moleculares para ensayos de comunidades de hongos del suelo fueron extraídas, principalmente, de estudios sobre la diversidad bacteriana y, generalmente, contienen las mismas limitaciones que las técnicas de cultivos para hongos (Selenska y Klingmüller, 1992; Tsai y Olson, 1992; O'Donnell *et al.*, 1994). No obstante, en el caso de los hongos el número de especies no cultivables es, sin duda, exagerado. Lo que puede ser verdad para organismos estrictamente simbióticos, como hongos micorrízicos arbusculares, no se aplica en el caso de hongos saprófitos. Incluso la mayoría de los hongos patógenos de plantas no son parásitos obligados. Muchos obstáculos para la identificación basada en cultivos han sido superados con la llegada de técnicas de aislamiento más sofisticadas como, por ejemplo, los métodos de lavado del suelo y la filtración de partículas, tal y como ha sido discutido. Las técnicas de huella molecular en comunidades puede monitorear composiciones complejas de hongos de suelo, pero una mejor caracterización y análisis filogenético de taxas dominantes, invariablemente, requieren de una secuenciación y comparación utilizando bancos de datos de DNA al alcance del público. Sin embargo, los enfoques taxonómicos de hongos basados únicamente en datos moleculares, pueden presentar algunos problemas debido a que los bancos de datos pueden estar incompletos y puede que las secuencias de DNA se encuentren mal identificadas, lo que origina errores en identificaciones morfológicas, amplificación y secuenciación de contaminantes de hongos e incluso, en la secuenciación de quimeras (Crous, 2002a; Bridge *et al.*, 2003; Hawksworth, 2004b).

Otra limitación del enfoque molecular basada en la amplificación del DNA es la falta de conocimientos acerca de la actividad de crecimiento o grupos funcionales

de hongos del DNA total extraído del suelo. Como se ha discutido, los protocolos de extracción del DNA son capaces de lisar y extraer ácidos nucleicos ya sea de micelio en crecimiento activo o de esporas latentes, haciendo difícil la diferencia del crecimiento activo o grupos funcionales basados únicamente en el producto del análisis del PCR. Por el momento, un entendimiento más completo sobre las comunidades de hongos del suelo deberá centrarse en enfoques polifásicos con ensayos basados en cultivos y taxonomía molecular en asociación con el estudio de los procesos biogeoquímicos que ocurren en el suelo (Malosso *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006).

ANÁLISIS DE DATOS

Una lista de especies o agregados de especies aisladas y su abundancia relativa en cada muestra, generalmente, constituye el primer conjunto de datos. Se verifica el número de cepas de cada muestra y este dato puede ser usado para comparar entre sitios, fechas de colecta o diferentes tratamientos de suelo. La prueba de independencia de Chi cuadrada puede usarse para este análisis, donde el número total de cepas de cada muestra se usa en comparaciones pareadas. Cuando están disponibles datos sobre variaciones cuantitativas entre las repeticiones dentro de las muestras, un enfoque más confiable es realizar un análisis de varianza (ANOVA). Por medio del ANOVA es posible derivar variaciones entre diferentes muestras y dentro de las muestras (error); por lo tanto, resulta ser un análisis robusto y confiable (Sokal y Rolf, 1995). Adicionalmente, otros factores, además del número de cepas, como parámetros físicos y químicos del suelo bajo análisis, pueden añadirse al ANOVA para evaluar sus efectos y sus interacciones con otros datos cuantitativos (Setälä y McLean, 2004). El conjunto de datos preliminares usualmente no es adecuado para hacer los análisis de ANOVA, dado que algunos de los datos no tienen una distribución normal. Para solucionar ese problema, las transformaciones de datos, tales como logaritmo o raíz cuadrada pueden aplicarse antes del análisis (Houston *et al.*, 1998). Otra opción consiste en llevar a cabo un análisis de varianza no paramétrico, por ejemplo, el análisis de Kruskal-Wallis (Rodrigues, 1994; Sokal y Rohlf, 1995).

Las curvas de acumulación de especies o curvas de rarefacción pueden proporcionar comparaciones gráficas de la riqueza de especies entre muestras, y también dan información sobre el esfuerzo de muestreo empleado en la investigación. La pendiente de las curvas muestra cuáles son las muestras con mayor riqueza de especies, por ejemplo, las curvas que se forman con más facilidad, de acuerdo con la acumulación de las cepas muestreadas. La forma de las curvas indica si el número

de especies es estable después de la acumulación de todas las cepas, por ejemplo, si las curvas tienden a llegar a una asíntota. Curvas que no tienden a una asíntota indican que el número de especies podría aumentar si se aumenta el esfuerzo de muestreo (Bills y Polishook, 1994).

La diversidad de especies de cualquier sistema está compuesta por dos componentes: la riqueza de especies (el número de especies) y la equitatividad o equidad de la frecuencia de especies (Kennedy y Smith, 1995). Muchos índices se han obtenido para evaluar y comparar la diversidad de especies, basándose en su riqueza o equitatividad o tomando ambas variables y éstos cambian en función de la importancia relativa que se da a la especie dominante, común o rara y a la complejidad de los modelos matemáticos que se basan en la distribución de las especies. El índice Shannon-Wiener se basa en la riqueza y equitatividad de la diversidad de las especies y se encuentra frecuentemente en la literatura (Dighton, 1994; Persiani *et al.*, 1998;). Los índices de similitud (disimilitud) de diversidad para realizar comparaciones pareadas entre diferentes muestras también son usados con frecuencia (Magurran, 1988; Bettucci *et al.*, 1993; Grishkan *et al.*, 2003). Los índices de diversidad son puramente numéricos y no proporcionan información sobre la estructura de la comunidad, y existen casos en donde dos comunidades distintas pueden tener el mismo índice de diversidad. La información sobre la estructura de la comunidad es mejor si se usa un análisis multivariado, tales como los métodos de ordenación. El análisis de correspondencia (AC) y su versión modificada, análisis de correspondencia sin tendencia, son métodos de ordenación adecuados para la clase de datos generados de hongos y de otras comunidades; por ejemplo, datos generados de conteos, matrices de datos de gran tamaño (llenas de ceros) y datos de distribución no paramétricos. En el caso de AC, al igual que en otras técnicas de ordenación, las relaciones multidimensionales entre muestras y especies se reducen a un número reducido de ejes que, idealmente, explican la mayoría de la variabilidad de datos. Los resultados se muestran gráficamente y permiten el análisis de tendencias generales de la estructura de la comunidad (Gauch, 1982; Howard y Robinson, 1995). El porcentaje de la varianza total explicada por el primer eje del AC y la contribución de las especies y muestras a la varianza (inerencia) de cada eje apoya la designación de especies que ocurren en la comunidad como clave y "casual" (Howard y Robinson, 1995). De manera general, el análisis multivariado no se lleva a cabo en el total de comunidad debido a la naturaleza "ruidosa" de la frecuencia y a la distribución de especies raras. De esta manera, se elige un límite (por ejem-

plo, 0.5%, 1% ó 5% del número total de aislamientos) y únicamente aquellas especies con una frecuencia de aislamientos igual o superior a este límite son incluidas en el análisis (Gauch, 1982; Bettucci y Alonso, 1995; Bettucci *et al.*, 2002). Los métodos de ordenación de análisis de componentes principales y análisis de correspondencia, así como el análisis de conglomerados (cluster), son normalmente empleados para derivar resultados procedentes de los métodos de huella molecular, en donde las matrices son construidas con datos de presencia o ausencia de bandas distintivas (de manera ideal para especies diferentes) en los geles y la estructura de la comunidad es analizada posteriormente (Fromin *et al.*, 2002; Oros-Sichler *et al.*, 2006).

PRESERVACIÓN Y COLECCIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS

Los inventarios de biodiversidad proporcionan argumentos y algunas bases científicas para la preservación de hábitats y el uso sustentable de suelos, por lo tanto, es necesario que sean recopilados. Las colecciones de recursos genéticos hoy en día son solicitadas en todo el mundo, con el objetivo de la preservar las especies *ex situ* y de suministrar a instituciones de investigación e industrias de este material. Las colecciones de referencia deberían ser apoyadas por países con una política fuerte en ciencia y tecnología dado que contienen información acerca de la distribución geográfica y de los hospederos, por lo que proveen material de trabajo básico para quienes estudian las características y la variación, al igual que las aplicaciones prácticas y económicas de las especies (Smith y Waller, 1992; Hawksworth, 1993; Kirsop, 1996). El estatus actual de las colecciones de recursos genéticos de hongos y los retos para apoyar la necesidad de la genómica de hongos, la biología molecular y la conservación de hongos han sido revisados recientemente (Hawksworth, 1996, 2004a; Ryan y Smith, 2004). En el futuro, para la preservación a largo plazo de especímenes de resguardo será fundamental validar las entradas de secuencia y bases de datos genómicas, como en el caso de la publicación de nuevos nombres (Agerer *et al.*, 2003).

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Richard Mibey y a la Dr. Sheila Okoth por sus comentarios y discusiones durante la preparación del capítulo.

REFERENCIAS

- Agerer, R., Ammirati, J., Blanz, P., Courtecuisse, R., Dejardin, D.E., Gams, W., Hallenberg, N., Halling, R., Hawksworth, D. L., Horak, E., Korf, R.P., Mueller, G. M., Oberwinkler, F., Rambold, G., Summerbell, R. C., Triebel, D. y Watling, R. (2003) 'Always deposit vouchers' *Mycological Research*, vol. 104, pp. 642-644.
- Agnelli, A., Ascher, J., Cortia, G., Ceccherini, M. T., Nannipieri, P. y Pietramellar, G. (2004) 'Distribution of microbial communities in a forest soil profile investigated by microbial biomass, soil respiration', *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 36, pp. 859-868.
- Anderson, I. C. y Cairney, J. W. G. (2004) 'Diversity and ecology of soil fungal communities: Increased understanding through the application of molecular techniques', *Environmental Microbiology*, vol. 6, pp. 769-779.
- Anderson, I. C., Campbell, C. D. y Prosser, J. I. (2003) 'Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil', *Environmental Microbiology*, vol. 5, pp. 36-47.
- Bååth, E. (1988) "A critical examination of the soil washing technique with special reference to the effect of the size of the soil particles", *Canadian Journal of Botany*, vol. 66, pp. 1566-1569.
- Baayen, R. P., O'Donnell, K., Bonants, P. J. M., Cigelnik, E., Kroon, L. P. N., Roebroek, E. J. A. y Waalwijk, C. (2000) 'Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease', *Phytopathology*, vol. 90, pp. 891-900.
- Baek, J. y Kenerley, C. M. (1998) 'Detection and enumeration of a genetically modified fungus in soil environments by quantitative competitive polymerase chain reaction', *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 25, pp. 419-428.
- Barratt, S. R., Ennos, A. R., Greenhalgh, M., Robson, G. D. y Handley, P. S. (2003) 'Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities', *Journal of Applied Microbiology*, vol. 95, pp. 78-85.
- Bauer, R., Begerow, D., Sampaio, J. P., Weiss, M. y Oberwinkler, F. (2006) 'The simpleseptate basidiomycetes: A synopsis', *Mycological Progress*, vol. 5, pp. 41-66.
- Beare, M. H., Vikram Reddy, M., Tian, G. y Srivastava, S. C. (1997) 'Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function in the tropics, the role of decomposer organisms', *Applied Soil Ecology*, vol. 6, pp. 87-108.
- Bettucci, L. y Alonso, R. (1995) 'The effect of wildfire on the opportunistic decomposer fungal community of Uruguayan *Eucalyptus* spp. forest', *Pedobiologia*, vol. 39, pp. 470-480.

- Bettucci, L., Malvarez, I., Dupont, J., Bury, E. y Roquebert, M. F. (2002) 'Paraná river delta wetlands soil microfungi', *Pedobiologia*, vol. 46, pp. 606–623.
- Bettucci, L., Rodriguez, C. y Indarte, R. (1993) 'Fungal communities of two grazing-land soils in Uruguay', *Pedobiologia*, vol. 37, pp. 72–82.
- Bills, G. F. y Polishook, J. D. (1994) 'Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica', *Mycologia*, vol. 86, pp. 187–198.
- Bills, G. F., Christensen, M., Powell, M. y Thorn, G. (2004) 'Saprobic soil fungi', in G. M. Mueller, G. F. Bills y M. S. Foster (eds) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, Elsevier, Amsterdam, pp. 271–302.
- Bonkowski, M., Griffith, B. S. y Ritz, K. (2000) 'Food preference of earthworms for soil fungi', *Pedobiologia*, vol. 44, pp. 666–676.
- Bordjiba, O., Steiman, R., Kadri, M., Semadi, A. y Guiraud, P. (2001) 'Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil', *Journal of Environmental Quality*, vol. 30, pp. 418–426.
- Borneman, J. y Hartin, R. J. (2000) 'PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, pp. 4356–4360.
- Bridge, P. D. y Spooner, B. M. (2001) 'Soil fungi, diversity and detection', *Plant and Soil*, vol. 232, pp. 147–154.
- Bridge, P. D., Roberts, P. J., Spooner, B. M. y Panchal, G. (2003) 'On the unreliability of published DNA sequences', *New Phytologist*, vol. 160, pp. 43–48.
- Brodie, E., Edwards, S. y Clipson, N. (2003) 'Soil fungal community structure in a temperate upland grassland soil', *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 45, pp. 105–114.
- Cannon, P. F. (1996) 'Filamentous fungi', in G. Hall (ed) *Methods for the Examination of Organismal Diversity in Soils and Sediments*, CAB International, Wallingford, pp. 127–145.
- Chet, I. y Baker, K. F. (1980) 'Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil', *Phytopathology*, vol. 70, pp. 994–998.
- Crous, P. W. (2002a) 'Adhering to good cultural practice', *Mycological Research*, vol. 106, pp. 1378–1379.
- Crous, P. W. (2002b) *Taxonomy and Pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and Allied Genera*, APS Press, St Paul, MN.
- Cullen, D. W., Lees, A. K., Toth, I. K. y Duncan, J. M. (2002) 'Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR', *Plant Pathology*, vol. 51, pp. 281–292.
- Dackman, C., Olsson, S., Jansson, H., Lundgren, B. y Nordbring-Hertz, B. (1987) 'Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi in soil', *Microbial Ecology*, vol. 13, pp. 89–93.

- Davet, P. y Rouxel, F. (2000) *Detection and Isolation of Soil Fungi*, Science Publishers, Enfield.
- Dhingra, O. D. y Sinclair, J. B. (1985) *Basic Plant Pathology Methods*, CRC Press Inc., Boca Raton.
- Dick, M. W. (2001) *Straminipilous Fungi*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dighton, J. (1994) 'Analysis of micromycete communities in soil: A critique of methods', *Mycological Research*, vol. 98, pp. 796–798.
- Domsch, K. H., Gams, W. y Anderson, T. (2007) *Compendium of Soil Fungi, 2nd edition*, IHW Verlag, Eching.
- Down, G. (2002) 'Fungal family trees: Finding relationships from molecular data', *Mycologist*, vol. 16, pp. 51–58.
- Edel, V., Steinberg, C., Gautheron, N., Recorbet, G. y Alabouvette, G. (2001) 'Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France', *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 36, pp. 61–71.
- Edel-Hermann, V., Dreumont, C., Pérez-Piqueres, A. y Steinberg, C. (2004) 'Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of ribosomal RNA genes to assess changes in fungal community structure in soils', *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 47, pp. 397–404.
- Edena, M. A., Hillb, R. A. y Galpoththage, M. (2000) 'An efficient baiting assay for quantification of *Phytophthora cinnamomi* in soil', *Plant Pathology*, vol. 49, pp. 515–522.
- Elsas, J. D., Duarte, G. F., Keijzer-Wolters, A. y Smit, E. (2000) 'Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis', *Journal Microbiological Methods*, vol. 43, pp. 133–151.
- Fillion, M., St-Arnaud, M. y Jabaji-Hare, S. H. (2003) 'Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real-time PCR', *Journal of Microbiological Methods*, vol. 53, pp. 67–76.
- Frankland, J., Dighton, J. y Boddy, L. (1990) 'Methods for studying fungi in soil and forest litter', in R. G. Grigorova y J. R. Norris (eds) *Methods in Microbiology*, vol. 22, Academic Press, London, pp. 343–404.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teysier-Cuvette, S., Gillet, F., Aragno, M. y Rossi, M. (2002) 'Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns', *Environmental Microbiology*, vol. 11, pp. 634–643.

- Gams, W. (1992) 'The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil fungi', in W. Winterhoff (ed) *Fungi in Vegetation Science*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 183–223.
- Gams, W., Hoekstra, E. S. y Aptroot, A. (1998) *CBS Course of Mycology*, 4th edition, CBS, Baarn, The Netherlands.
- Gauch, H. G., Jr (1982) *Multivariate Analysis in Community Ecology*, Cambridge University Press, New York.
- Gomes, N. C. M., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N. G., Buchner, A., Mendonça-Hagler, L. y Smalla, K. (2003) Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, pp. 3758–3766.
- Gonçalves, R. C., Alfenas, A. C., Maffia, L. A. y Crous, P. W. (2001) 'Evaluation of bioassays to quantify *Cylindrocladium* inocula soil', *Mycoscience*, vol. 41, pp. 261–264.
- Gray, T. R. G. (1990) 'Methods for studying the microbial ecology of soil', in R. G. Grigoriyeva y J. R. Norris (eds) *Methods in Microbiology*, vol. 22, Academic Press, London, pp. 310–342.
- Grishkan, I., Nevo, E., Wasser, S. P. y Beharav, A. (2003) 'Adaptive spatiotemporal distribution of soil microfungi in 'Evolution Canyon' II, Lower Nahal Keziv, western Upper Galilee, Israel', *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 78, pp. 527–539.
- Hawksworth, D. L. (1991) 'The fungal dimension of biodiversity, magnitude, significance and conservation', *Mycological Research*, vol. 95, pp. 641–655.
- Hawksworth, D. L. (1993) 'The tropical fungal biota, census, pertinence, prophylaxis, and prognosis', in S. Isaac, J. C. Frankland, R. Watling y A. J. S. Whalley (eds) *Aspects of Tropical Mycology*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hawksworth, D. L. (1996) 'Microbial collections as a tool in biodiversity and biosystematic research', in R. A. Samson, J. A. Stalpers, D. van der Mei y A. H. Stouthamer (eds) *Culture Collections to Improve Quality of Life*, Proceedings of the International Congress for Culture Collections, CBS, Baarn, pp. 26–35.
- Hawksworth, D. L. (2004a) 'Fungal diversity and its implications for genetic resource collections', *Studies in Mycology*, vol. 50, pp. 9–18.
- Hawksworth, D. L. (2004b) "'Misidentifications" in fungal DNA sequence databanks', *New Phytologist*, vol. 161, pp. 13–15.
- Hawksworth, D. L. y Rossman, A. Y. (1997) 'Where are all the undescribed fungi?', *Phytopathology*, vol. 87, pp. 888–891.
- He, J., Xu, Z. y Hughes, J. (2005) 'Analyses of soil fungal communities in adjacent natural forest and hoop pine plantation ecosystems of subtropical Australia using molecular approaches based on 18S rRNA genes', *FEMS Microbiology Letters*, vol. 247, pp. 91–100.

- Houston, A. P. C., Visser, S. y Lautenschlager, R. A. (1998) 'Microbial processes and fungal community structure in soils from clear-cut and unharvested areas of two mixed wood forests', *Canadian Journal of Botany*, vol. 76, pp. 630–640.
- Howard, P. J. A. y Robinson, C. H. (1995) 'The use of correspondence analysis in studies of successions of soil organisms', *Pedobiologia*, vol. 39, pp. 518–527.
- Hyde, K. D. (ed) (1997a) *Biodiversity of Tropical Microfungi*, Hong Kong University Press, Hong Kong.
- Hyde, K. D. (1997b) 'Can we rapidly measure fungal diversity?', *Mycologist*, vol. 11, pp. 176–178.
- Kacprzak, M. y Stanczyk-Mazanek, E. (2003) 'Changes in the structure of fungal communities of soil treated with sewage sludge', *Biology and Fertility of Soils*, vol. 38, pp. 89–95.
- Kennedy, A. C. y Smith, K. L. (1995) 'Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils', *Plant and Soil*, vol. 170, pp. 75–86.
- Kennedy, N., Edwards, S. y Clipson, N. (2005) 'Soil bacterial and fungal community structure across a range of unimproved and semi-improved upland grasslands', *Microbial Ecology*, vol. 50, pp. 463–473.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. y Stalpers, J. A. (2001) *Dictionary of the Fungi*, 9th edition, CAB International, Wallingford.
- Kirsop, B. (ed) (1996) *Access to Ex-situ microbial genetic resources within the framework to the convention on Biological Diversity*, World Federation of Culture Collections, WFCC.
- Lang, E. y Jagnow, G. (1986) 'Fungi of a forest soil nitrifying at low pH values', *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 38, pp. 257–265.
- Lee, D., Zo, Y. y Kim, S. (1996) 'Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR single-strand-conformation polymorphism', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, pp. 3112–3120.
- Lees, A. K., Cullen, D. W., Sullivan, L. y Nicholson, M. J. (2002) 'Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil', *Plant Pathology*, vol. 51, pp. 293–302.
- Li, S. y Hartman, G. L. (2003) 'Molecular detection of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* in soybean roots and soil', *Plant Pathology*, vol. 52, pp. 74–83.
- Liu, W., Marsh, T. L., Cheng, H. y Forney, L. (1997) 'Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16s rRNA', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, pp. 4516–4522.
- Lodge, D. J. (1993) 'Nutrient cycling by fungi in wet tropical forests', in S. Isaac, J. C. Frankland, R. Watling y A. J. S. Whalley (eds) *Aspects of Tropical Mycology*, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 37–58.

- Lodge, D. J (1997) 'Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests', *Biodiversity and Conservation*, vol. 6, pp. 681–688
- Lowell, J. L. y Klein, D. A. (2001) 'Comparative single-strand conformation polymorphism (SSCP) and microscopy-based analysis of nitrogen cultivation interactive effects on the fungal community of a semiarid steppe soil', *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 36, pp. 85–92.
- Magurran, A. E. (1988) *Ecological Diversity and its Measurement*, Princeton University Press, Princeton.
- Malosso, E., Waite, I. S., English, L., Hopkins, D. W. y O'Donnell, A. G. (2006) "Fungal diversity in maritime Antarctic soils determined using a combination of culture isolation, molecular fingerprinting and cloning techniques", *Polar Biology*, vol. 29, pp. 552–561.
- Marks, G. C. y Mitchell, J. E. (1970) 'Detection, isolation and pathogenicity of *Phytophthora megasperma* from soils and estimation of inoculum levels', *Phytopathology*, vol. 60, pp. 1687–1690.
- Masago, H., Yoshikawa, M., Fukada, M. y Nakanishi, N. (1977) 'Selective inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants', *Phytopathology*, vol. 67, pp. 425–428.
- Mauchline, T. H., Kerry, B. R. y Hirsch, P. R. (2002) 'Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, pp. 1846–1853.
- Mazzola, M. (2002) 'Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases', *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 81, pp. 557–564.
- Mazzola, M. (2004) 'Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression', *Annual Review of Plant Pathology*, vol. 42, pp. 35–59.
- Milling, A., Smalla, K., Maidl, F. X., Schloter, M. y Munch, J. C. (2004) 'Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi', *Plant and Soil*, vol. 266, pp. 23–39.
- Moreira, F. M. S. y Siqueira, J. O. (2002) *Microbiologia e bioquímica do solo*, Editora UFLA, Lavras, Brazil.
- Muyzer, G. y Smalla, K. (1998) 'Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology', *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 73 pp. 127–141.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. y Uitterlinden, A. G. (1993) 'Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient electrophoresis analysis of polymerase chain reac-

- tion-amplified genes coding for 16S rRNA', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, pp. 695–700.
- Nechwatal, J., Schlenzig, A., Jung, T., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M. y Osswald, W. F. (2001) 'A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples from oak stands', *Forest Pathology*, vol. 31, pp. 85–97.
- Nikolcheva, L. G. and Bärlocher, F. (2004) "Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream", *Mycological Progress*, vol. 3, pp. 41–49.
- O'Donnell, A. G., Goodfellow, M. y Hawksworth, D. L. (1994) 'Theoretical and practical aspects of the quantification of biodiversity among microorganisms', *Philosophical Transactions Royal Society London, B. Biological Sciences*, vol. 345, pp. 65–73.
- O'Donnell, K. y Cigelnik, E. (1997) 'Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 7, pp. 103–116.
- Oros-Sichler, M., Gomes, N. C. M., Neuber, G. y Smalla, K. (2006) 'A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities', *Journal of Microbiological Methods*, vol. 6, pp. 63–75.
- Papavizas, G. C., Adams, P. B., Lomsden, R. D., Lewis, J. A., Dow, R. L., Ayers, W. A. y Kantzer, J. G. (1975) 'Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil', *Phytopathology*, vol. 65, pp. 871–877.
- Persiani, A. M., Maggi, O., Casado, M. A. y Pineda, F. D. (1998) 'Diversity and variability in soil fungi from a disturbed tropical rain forest', *Mycologia*, vol. 90, pp. 206–214.
- Pettitt, T. R., Wakeham, A. J., Wainwright, M. F. y White, J. G. (2002) 'Comparison of serological, culture, and bait methods for detection of *Pythium* and *Phytophthora* zoospores in water', *Plant Pathology*, vol. 51, pp. 720–727.
- Pfenning, L. H. (1997) 'Soil and rhizosphere microfungi from Brazilian tropical forest ecosystems', in K. D. Hyde (ed) *Biodiversity of Tropical Microfungi*, Hong Kong University Press, Hong Kong, pp. 341–365.
- Ranjard, L., Poly, F., Lata, J. C., Mouguet, C., Thioulouse, J. y Nazaret, S. (2001) 'Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints, biological and methodological variability', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, pp. 4479–4487.
- Rodrigues, K. F. (1994) 'The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*', *Mycologia*, vol. 86, pp. 376–385.

- Rodrigues-Guzman, M. P. (2001) "Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de Mexico", *Acta Zoológica Mexicana*, special issue no 1, pp. 53–78.
- Rossmann, A. Y., Tulloss, R. E., O'Dell, T. E. y Thorn, R. G. (1998) *Protocols for an All Taxa Biodiversity Inventory of Fungi in a Costa Rican Conservation Area*, Parkway Publishers, Boone, NC.
- Ryan, M. J. y Smith, D. (2004) 'Fungal genetic resource centres and the genomic challenge', *Mycological Research*, vol. 108, pp. 1351–1362.
- Sanfuentes, E., Alfenas, A. C., Maffia, L. A. y Silveira, S. F. (2002) 'Comparison of baits to quantify inoculum density of *Rhizoctonia* spp. in Eucalyptus clonal garden soils', *Australasian Plant Pathology*, vol. 31, pp. 177–183.
- Schneider, R. W. (1984) *Suppressive Soils and Plant Disease*, APS Press, St. Paul, MN.
- Schuessler, A., Schwarzott, D. y Walker C. (2001) 'A new fungal phylum, the Glomeromycota: Phylogeny and evolution', *Mycological Research*, vol. 105, pp. 1413–1421.
- Selenska, S. y Klingmüller, W. (1992) "Direct recovery and molecular analysis of DNA and RNA from soil", *Microbial Releases*, vol. 1, pp. 41–46.
- Setälä, H. y McLean, M. A. (2004) 'Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi', *Oecologia*, vol. 139, pp. 98–107.
- Siebert, P. D. y Larrick, J. W. (1992) 'Competitive PCR', *Nature*, vol. 359, pp. 557–558.
- Silva, M., Umbuzeiro, G. A., Pfenning, L. H., Canhos, V. P. y Esposito, E (2003) 'Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges', *Soil and Sediment Contamination*, vol. 12, pp. 345–356.
- Singh, B. K., Munro, S., Reid, E., Ord, B., Potts, J. M., Paterson, E. y Millard, P. (2006) 'Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods', *European Journal of Soil Science*, vol. 57, pp. 72–82.
- Singleton, L. L., Mihail, J. D. y Rush, C. M. (1992) *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*, APS Press, St Paul, MN.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B. y van Elsas, J. D. (1999) 'Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, pp. 2614–2621.
- Smith, D. y Waller, J. M. (1992) 'Culture collections of microorganisms, their importance in tropical plant pathology', *Fitopatologia Brasileira*, vol. 17, pp. 5–12.
- Sneh B., Burpee, L. y Ogoshi, A. (1991) *Identification of Rhizoctonia Species*, APS Press, St. Paul, MN.
- Sokal, R. R. y Rohlf, J. F. (1995) *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd edition, W. H. Freeman, New York.

- Thorn, R. G., Reddy, C. A., Harris, D. y Paul, E. A. (1996) 'Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil', *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62, pp. 4288–4292.
- Tsai, Y. L. y Olson, B. H. (1992) 'Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments', *Applied Environmental Microbiology*, vol. 58, pp. 1070–1074.
- Tsao, P. H., Erwin, D. C. y Bartnicki-Garcia, S. (1983) *Phytophthora, its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, APS Press, St. Paul, MN.
- Vandenkoornhuysse, P., Baldauf, S., Leyval, C., Straczek, J. y Young, J. P. W. (2002) 'Extensive fungal diversity in plant roots', *Science*, vol. 295, p. 2051.
- Viaud, M., Pasquier, A. y Brygoo, Y. (2000) 'Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS', *Mycological Research*, vol. 104, pp. 1027–1032.
- Wainwright, M. (1988) 'Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil: A review', *Transactions of the British Mycological Society*, vol. 90, pp. 159–170.
- Wellington, E. M. H., Berry, A. y Krsek, M. (2003) 'Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil, exploiting genomics and stable isotope probing', *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, pp. 295–301.
- Whipps, J. M., McQuilken, M. P. y Budge, S. P. (1993) 'Use of fungal antagonists for biocontrol of damping-off and *Sclerotinia* disease', *Pesticide Science*, vol. 37, pp. 309–317.
- Widden, P. y Parkinson, D. (1973) 'Fungi from Canadian coniferous forest soils', *Canadian Journal of Botany*, vol. 51, pp. 2275–2290.
- Yergeau, E., Filion, M., Vujanovic, V. y St-Arnaud, M. (2005) 'A PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to assess *Fusarium* diversity in asparagus', *Journal of Microbiological Methods*, vol. 60, pp. 143–154.
- Zak, J. C. y Visser, S. (1996) 'An appraisal of soil fungal diversity: The crossroads between taxonomic and functional biodiversity', *Biodiversity and Conservation*, vol. 5, pp. 169–183.

MANUALES PARA IDENTIFICACIÓN

- Barnett, H. L. y Hunter, B. E. (1998) *Illustrated genera of imperfect fungi*, 4th edition, APS Press, St Paul, MN.
- Bissett, J. (1984) 'A revision of the genus *Trichoderma*, I. Section *Longibrachiatum* sect. nov.', *Canadian Journal of Botany*, vol. 62, pp. 924–931.
- Bissett, J. (1991a) 'A revision of the genus *Trichoderma*, II. Infrageneric classification', *Canadian Journal of Botany*, vol. 69, pp. 2357–2372.

- Bissett, J. (1991b) 'A revision of the genus *Trichoderma*, III. Section *Pachybasium*', *Canadian Journal of Botany*, vol. 69, pp. 2373–2417.
- Bissett, J. (1991c), 'A revision of the genus *Trichoderma*, IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*', *Canadian Journal of Botany*, vol. 69, pp. 2418–2420.
- Crous, P. W. (2002b) *Taxonomy and pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and allied genera*, APS Press, St Paul MN.
- Domsch, K. H., Gams, W. y Anderson, T. (2007) *Compendium of Soil Fungi*, 2nd edition, IHW Verlag, Eching.
- Ellis, M. B. (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*, CMI, Kew, London.
- Ellis, M. B. (1976) *More Dematiaceous Hyphomycetes*, CMI, Kew, London.
- Ellis, M. B. y Ellis, J. P. (1985) *Microfungi on Land Plants: An Identification Handbook*, expanded reprint (Richmond Publ. Co. 1997), Croom Helm, London.
- Erwin, D. C. y Ribeiro, O. L. K. (1996) *Phytophthora diseases worldwide*, APS Press, St Paul, MN.
- Gams, W., Hoekstra, E. S. y Aptroot, A. (1998) *CBS Course of Mycology*, 4th edition, CBS, Baarn, The Netherlands.
- Hanlin, R.T. 1990. *Illustrated genera of Ascomycetes*, vol. I, American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- Hanlin, R. T. (1998a) *Illustrated Genera of Ascomycetes*, vol. II, American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- Hanlin, R. T. (1998b) *Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes*, vols I and II, American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- Karling, J. S. (1977) *Chytridiomycetorum Iconographia*, J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. y Stalpers, J. A. (2001) *Dictionary of the Fungi*, 9th edition, CAB International, Wallingford.
- Klich, M. A. y Pitt, J. I. (1988) *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and Their Teleomorphs*, CSIRO, North Ryde, Australia.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. y Bullock, S. (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*, Blackwell Publishers, Malden, MA.
- Nag Raj, T. R. (1993) *Coelomycetous Anamorphs with Appendage-bearing Conidia*, Mycologue Publications, Waterloo.
- Pitt, J. I. (2000) *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, 3rd edition, CSIRO, North Ryde, Australia.
- Rondon, M. R., August, P. R., Betterman, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., y Goodman, R. M. (2000) 'Cloning the soil me-

- tagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms', *Applied Environmental Microbiology*, vol. 66, pp. 2541–2547.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. y Filtenborg, O. (2000) *Introduction to Food and Air-borne Fungi*, 6th edition, CBS, Baarn, The Netherlands.
- Sneh, B., Burpee, L. y Ogoshi, A. (1991) *Identification of Rhizoctonia species*, APS Press, St Paul, MN.
- Sutton, B. C. (1980) *The Coelomycetes*, CMI, Kew, London.
- Tsao, P. H., Erwin, D. C. y Bartnicki-Garcia, S. (1983) *Phytophthora: Its biology, taxonomy, ecology and pathology*, APS Press, St Paul, MN.
- Waterhouse, G. M. (1967) 'A key to *Pythium* Pringsheim', *Mycological Papers*, vol. 109, pp1–15.
- Waterhouse, G. M. (1968) 'The genus *Pythium* Pringsheim: Diagnoses or descriptions and figures from the original papers', *Mycological Papers*, vol. 110, pp. 1–50.
- Waterhouse, G. M. (1970) 'The genus *Phytophthora* de Bary: Diagnoses or descriptions and figures from the original papers', *Mycological Papers*, vol. 122, pp. 1–59.

SITIOS WEB

- Johnson, T. W., Jr, Seymour, R. L. y Padgett, D. E. (2002) 'Biology and systematics of Saprolegniaceae', www.uncw.edu/people/padgett/book, accessed November 2002.
- Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F. y McCray, E. B. (undated) 'Trichoderma Online', Systematic Botany & Mycology Laboratory, ARS, USDA, <http://nt.ars-gring.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.

APÉNDICE 8.1 Medios de cultivo y aditivos: cebos

Las recetas son para un litro, basados en Gams *et al.* (1998) y Erwin y Ribeiro (1996).

MA2% - agar extracto de malta extracto de malta 20g agar 18g	CA + p.p.s zanahoria, molida 100g agar 18g penicilina 0.2g pimarcina 0.02g estreptomycin 0.1g
SNA – agar sintético pobre en nutrientes KH ₂ PO ₄ 1.0g KNO ₃ 1.0g MgSO ₄ x 7H ₂ O 0.5g KCL 0.5g glucosa 0.2g sacarosa 0.2g agar 18g	V8 agar V8 100 ml CaCO ₃ 2.0g agar 18g agua destilada 900 ml
OA – agar harina de avena Copos de avena 30g Agar 15g	PARP harina de maíz 17g pimarcina 10mg ampicilina 250mg rifampicilina 10mg pentacloronitrobenzeno 100mg himexazol 50mg
ADP – agar dextrosa y papa papa, cubitos 200g dextrosa 20g agar 18g	
PCA - agar papa zanahoria papa 20g zanahoria 20g agar 18g	AHM + p.p.s. –agar con harina de maíz harina de maíz 8.0g penicilina 0.2g pimarcina 0.02g estreptomycin 0.1g agar 18g
CA – agar zanahoria zanahoria, molida 100g agar 18g	MP5 - agar maltosa peptona maltosa 4.0g peptona 1.0g agar 18g
	Antibióticos, si es necesario penicilina 0.2g pimarcina 0.02g estreptomycin 0.1g

CEBOS

El uso de cebos es imprescindible para la recuperación de zoosporas formadas por hongos de sustratos complejos como el suelo. Dependiendo del tipo de hongo pueden ser utilizados cebos específicos. Los cebos de vegetales pueden ser lavados, los de origen animal son esterilizados usando luz UV por una hora.

Sustratos celulósicos: semillas de Sorghum, papel celofán, hojas secas de maíz, epidermis de cebolla, granos de polen de Pinus, trozos de manzana, papa, zanahoria o pepino.

Sustratos quitinosos: piel de serpiente, exoesqueleto de camarones, alas de insectos.

Sustratos queratinosos: cabellos de niños rubios.

CAPÍTULO 9

Muestreo, preservación e identificación de moscas de la fruta

Neliton Marques da Silva

INTRODUCCIÓN

Entre las plagas de la fruta de América tropical, las moscas de la fruta son consideradas una de las más preocupantes, debido al gran impacto económico que causan, ya que representan plagas primarias para la mayoría de los cultivos frutales. Se trata de insectos multivoltinos con un potencial biótico relativamente alto y una gran capacidad para infestar diferentes especies de frutos nativos y exóticos; éstas pertenecen al orden *Diptera*, y a la familia Tephritidae. Se distinguen cinco géneros importantes de esta plaga: *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis*, *Rhagoletis* y *Dacus*, que se extienden globalmente, excepto en la Antártida (White y Elson-Harris, 1992). Algunos estudios han acentuado aspectos ecológicos y etológicos de las moscas de la fruta, en su mayor parte, enfocados a las fases de pupa y larva (Silva *et al.*, 1996; Zucchi *et al.*, 1996). Las moscas de la fruta muestran un comportamiento y una taxonomía complejos (Bateman, 1972; Steck y Wharton, 1988). Su clasificación se basa exclusivamente en los caracteres morfológicos del adulto, y su sexo es fácilmente distinguible debido a que las hembras tienen un prominente ovopositor, con una punta larga y delgada, al final del abdomen. Las características taxonómicas que permitan distinguir sexos entre pupas y larvas aún no se han determinado (Salles, 2000).

Los daños que producen las moscas de la fruta se dan durante la fase inmadura, el periodo durante el cual la larva destruye la pulpa de la fruta, volviéndola

inservible para cosecha o consumo. Antes de llegar al estado adulto, las larvas migran de la fruta para pupar en el suelo (Ilustración 8a); por lo tanto, la mosca de la fruta es un habitante temporal del suelo, pues sólo permanece ahí durante una etapa de su vida.

Después de que la fruta infestada cae, las larvas se mueven sobre la superficie del suelo buscando condiciones adecuadas para su desarrollo y penetran hasta una profundidad aproximada de 10 cm para entrar en la fase de pupa. Esta profundidad varía dependiendo de las condiciones físicas del suelo, sobre todo, en función de la temperatura, la humedad y la textura. El desarrollo de la pupa ocurre en el suelo; por ello, durante una parte de su ciclo de vida, la mosca de la fruta se puede considerar un organismo del suelo. La fase pupal dura de 8 a 10 días, dependiendo de la temperatura y de la humedad, y constituye una de las fases más vulnerables al estrés abiótico y a muchos enemigos naturales, en su mayor parte depredadores y entomopatógenos como bacterias, hongos y nematodos, que también forman parte de la biota del suelo (véase Capítulo 10). Estos antagonistas juegan un papel importante en el control biológico de las moscas de la fruta. Aun cuando las larvas son parasitadas dentro de los frutos, el parasitoide adulto puede emerger en el suelo, de ahí que, resulta de suma importancia que en el diseño de la estrategia del manejo integrado de plagas se tome en cuenta la biodiversidad del suelo como un factor fundamental que influye en la mortalidad de larvas y pupas.

Debido a que el ciclo de vida involucra las partes aéreas de la planta hospedera, junto con el suelo, los procedimientos para muestrear varían de acuerdo con la fase y el propósito. En el caso de la mosca adulta, que es diurna y responde a estímulos visuales y olfativos, el uso de trampas con cebos alimenticios es lo más recomendable; sin embargo, esta técnica representa una relación ambigua entre la mosca y su hospedero, puesto que ésta sólo se puede establecer usando frutos infectados, ramas o semillas en donde las larvas de la mosca residían previamente.

MUESTREO DE LA MOSCA DE LA FRUTA

El muestreo de adultos de moscas de la fruta se lleva a cabo utilizando trampas McPhail (Ilustración 8b) con atrayente alimenticio, normalmente, 200 ml de proteína hidrolizada de maíz (5% en agua preservada con tetraborato de sodio con un pH entre 8.5 y 9). De manera alternativa, se puede utilizar jugo de fruta al 10%, azúcar al 10% o jarabe de caña de azúcar al 10%. Los cebos deberán reemplazarse cada semana y los especímenes capturados, removidos.

Las trampas se instalan en el centro del dosel de los árboles y su localización será tomada con GPS. El número de trampas por unidad de superficie puede variar de acuerdo con los objetivos del proyecto. Si el objetivo es monitorear plagas, una trampa cada cuatro hectáreas resulta suficiente. Cuando el objetivo es el manejo integrado, la densidad deberá ser de tres a cinco trampas por hectárea o estar de acuerdo con el tipo de uso de suelo existente en el predio; es decir, cada tipo de uso de suelo existente debe ser monitoreado con la misma densidad de trampas. Hasta cinco trampas por hectárea pueden ser instaladas en áreas con arbustos o árboles (jardines caseros); mientras que, hasta tres por hectárea son las recomendadas para plantaciones herbáceas.

En el caso de plantas herbáceas, la trampa puede utilizar como soporte tres palitos, dispuestos en forma de trípode, o bien, colocarse sobre un árbol adyacente, si lo hay. Las trampas deberán ser colocadas de manera equidistante.

COLECCIONANDO LOS ADULTOS CAPTURADOS

Debido a la probabilidad de que distintos grupos taxonómicos de insectos sean capturados, primero será necesario separar las moscas de la fruta de otros especímenes; esto se puede llevar a cabo en el campo o en el laboratorio. Cuando los cebos son reemplazados, el contenido de la trampa deberá pasarse por una malla de *nylon* de 1.5 mm para remover las moscas y separarlas de otros grupos taxonómicos utilizando unas pinzas curvas. Se anota el sexo y se colocan en frascos de vidrio (de alrededor de 50 ml) etiquetados, con alcohol al 70% para su identificación posterior. La etiqueta deberá incluir la información básica de muestreo y el número de la trampa. Por ejemplo:

- Manaus-AM
- Brasil
- 04° 05'S; 60° 04'W
- 23/Marzo/2006
- Silva, N. M.
- Trampa No 5

También deberá ser registrada la identidad de individuos de otros grupos taxonómicos capturados en las trampas.

MUESTREO DE LA FRUTA

Para poder establecer la relación entre las especies *Anastrepha* con sus plantas hospederas, se recogen frutos al azar en diferentes agroecosistemas y en diferente estado de maduración. Los frutos deberán ser colectados directamente de los árboles o inmediatamente después de caer al suelo. Los frutos muestreados se separan por especie, se protegen con bolsas de tela y se transportan en cajas térmicas hasta el laboratorio. Posteriormente, se pesan, se cuentan y se separan para cada sitio de muestreo; se depositan en charolas de plástico con una capa de vermiculita o arena fina como sustrato de pupación. Finalmente, las charolas se cubren con una tela de gasa y se aseguran con ligas de plástico para prevenir que se escapen las moscas adultas al emerger.

OBTENCIÓN DE LAS PUPAS

La vermiculita o arena fina deberá pasarse por una malla galvanizada, de 1.5 mm, para separar las pupas que posteriormente serán colocadas en jaulas, con sus respectivas etiquetas de identificación, para permitir la salida de las moscas adultas y/o parasitoides. Estas jaulas deberán ser examinadas diariamente.

Los adultos emergidos serán retenidos, durante 48 horas para permitir el endurecimiento cuticular y la pigmentación completa de los patrones alares (Ilustración 8c): características de gran importancia para la identificación taxonómica.

Después de emergidas, las moscas adultas son alimentadas con una solución de miel disuelta en agua al 10% que será cambiada cada día.

Las fechas de emergencia, el número y el sexo deberán quedar registrados con relación a las moscas o parasitoides. Finalmente, los especímenes recuperados son fijados en una solución de alcohol al 70%. La determinación de la relación de sexos hembra-macho (SR) para moscas adultas y parasitoides se hace de acuerdo con Silveira-Neto (1976) en función de la siguiente ecuación:

$$SR = \frac{\text{Número de hembras}}{\text{Número de hembras} + \text{Número de machos}}$$

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

La identificación taxonómica de especies de Tephritidae se basa en un examen ventral de la región apical, el aculeo de la hembra bajo un microscopio estereoscó-

pico (40X) o mediante el montaje sobre laminillas para examinar estas estructuras, utilizando un microscopio de transmisión (100X).

En primer lugar, es necesario extraer completamente el aculeo de la funda del ovipositor con ayuda de agujas o pinzas (Ilustración 8d), como lo describe Zucchi (1988). La identificación de especies del género *Anastrepha* se logra para las hembras adultas, comparando el patrón alar, coloración de cuerpo, mesonoto, tergito medio, abdomen y, especialmente, las características morfológicas del aculeo (Ilustración 8e) con especímenes de museo o usando claves taxonómicas, como las de Lima (1934), Stone (1942), Foote (1967), Steyskal (1977), Silva (1993), Ronchi-Teles (2002), Zucchi (1978 y 2000) y Norrbom (1985). Es recomendable que se depositen ejemplares de referencia en colecciones de museo, o que éstas sean incorporadas a la colección institucional del laboratorio.

REFERENCIAS

- Bateman, M. A. (1972) 'The ecology of fruit flies', *Annual Review Entomology*, vol. 17, pp. 493–518.
- Foote, R. H. (1967) 'Family Tephritidae', in M. Vanzolini (ed) *A Catalogue of the Diptera of the Americas South of the United States*, Secretaria da Agricultura, Departamento de Zoologia, São Paulo.
- Lima, A. C. (1934) "Moscas-de-frutas do gênero *Anastrepha* Schiner, 1868 (Diptera: Trypetidae)", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, vol. 28, no. 4, pp. 487–575.
- Norrbom, A. L. (1985) 'Phylogenetic analysis and taxonomy of the *cryptostrepha*, *daciiformis*, *robusta* and *schausi* species groups of *Anastrepha* Schiner (Diptera: Tephritidae)', PhD thesis, The Pennsylvania State University, Pennsylvania.
- Ronchi-Teles, B. (2002) "Ocorrência e flutuação populacional de espécies de moscas-das-frutas eparasitóides com ênfase para o Gênero *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) na Amazônia Brasileira", PhD Thesis, Federal University of the Amazon (UFAM) and National Institute for Agricultural Research (INPA), Manaus, Brazil.
- Salles, L. A. (2000) 'Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.)', in A. Malvasi and R. A. Zucchi (eds) *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado*, Ribeirão Preto, Holos, Brazil.
- Silva, N. M. (1993) "Levantamento e análise faunística de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em quatro locais do Estado do Amazonas", PhD Thesis, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", University of São Paulo, São Paulo.

- Silva, N. M., Zucchi, R. A. y Silveira Neto, S. (1996) 'The natural hosts plants of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) in the State of Amazonas, Brazil', in G. J. Steck and B. A. MacPherson (eds) *Fruit Fly Pests: A World Assessment of their Biology and Management*, CRC Press, Boca Raton.
- Silveira Neto, S., Nakano, O., Barbin, D. y Nova, N. A. V. (eds) (1976) *Manual de Ecologia dos Insetos*, Ceres, São Paulo.
- Steck, J. y Wharton, R. A. (1988) 'Description of immature stages of *Anastrepha interrupta*, *A. limae*, and *A. grandis* (Diptera: Tephritidae)', *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 81, no. 6, pp. 994–1003.
- Steyskal, G. C. (1977) *Pictorial Key to Species of the Genus Anastrepha (Diptera: Tephritidae)*, Entomological Society of Washington, Washington DC.
- Stone, A. (1942) 'The fruit flies of the genus *Anastrepha*', *United States Department of Agriculture Miscellaneous Publications*, vol. 439, pp. 1–112.
- White, I. M. y Elson-Harris, M. M. (1992) *Fruit Flies of Economic Significance: Their Identifications and Bionomics*, CAB International, Wallingford.
- Zucchi, R. A. (1978) "Taxonomia das espécies de *Anastrepha* Schiner 1868 (Diptera: Tephritidae) assinaladas no Brasil", PhD Thesis, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', University of São Paulo, São Paulo.
- Zucchi, R. A. (1988) "Moscas-das-frutas (Dip., Tephritidae) no Brasil: taxonomia, distribuição geográfica e hospedeiros", in H. L. M. de Souza (ed) *Moscas-das-frutas no Brasil*, Campinas, Fundação Cargill.
- Zucchi, R. A. (2000) 'Taxonomia', in A. Malavasi and R. A. Zucchi (eds) *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado*, Ribeirão Preto, Holos Zucchi, R. A., Silva, N. M. and Silveira Neto, S. (1996) '*Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) from the Brazilian Amazon: Distribution, hosts and lectotype designations', in G. J. Steck and B. A. MacPherson (eds) *Fruit Fly Pests: A World Assessment of their Biology and Management*, CRC Press, Boca Raton.

CAPÍTULO 10

Hongos y nematodos entomopatógenos

Alcides Moino, Jr y Ricardo Sousa Cavalcanti

INTRODUCCIÓN

Existe alrededor de medio millón de especies de insectos descritas en la tierra, aunque la cifra verdadera de diversidad puede ser mucho mayor (Groombridge, 1992). De éstas, aproximadamente, el 10% pueden considerarse plagas agrícolas forestales o urbanas. Si se asume que cada especie de insectos es susceptible a por lo menos un microorganismo patogénico, frecuentemente hospedante-específico, ello da la idea de la potencial importancia del estudio de estos patógenos de insectos en el contexto de control de plagas y de biodiversidad.

La patología de insectos es la ciencia que estudia las enfermedades de insectos, con el fin de utilizarlas como mecanismos de control de especies que son plaga, o bien, prevenir su ocurrencia en insectos benéficos. Las enfermedades son procesos dinámicos en donde el patógeno (microorganismo) y el hospedante (insecto) están adaptados morfológica y fisiológicamente; el primero para llevar a cabo el proceso de infección y el segundo, para resistir la enfermedad. El control microbiano es una forma de control biológico cuyo principio es el uso racional de entomopatógenos sin que necesariamente se eliminen las poblaciones de plagas, pero sí manteniéndolas en niveles por debajo del umbral de daño económico. Esto es similar a la dinámica natural que sucede en el campo entre el patógeno y su hospedante, sin intervención humana. Los principales microorganismos utilizados, y que han demostrado su

potencial en el control microbiano de insectos son: los hongos, las bacterias, los virus, los nematodos y los protozoarios.

Se conocen cientos de especies de hongos entomopatógenos que atacan una amplia gama de insectos y ácaros, con varios grados de especificidad con su hospedante (Hajek y St. Leger, 1994; Roy *et al.*, 2006). Los hongos producen esporas que germinan al contacto con el hospedante, invadiendo su cuerpo y matándolo de cuatro a diez días posteriores a la infección. Una vez muertos los insectos, se producen miles de nuevas esporas que se dispersan y continúan su ciclo de vida en nuevos hospedantes. Un pequeño número de especies generalistas con capacidad para ser cultivadas y producidas de manera masiva, como es el caso de *Lecanicillium logisporum*, se han utilizado como biopesticidas para su uso contra poblaciones de plagas, aunque esta tecnología no se ha adoptado por completo en la práctica, debido a su alto costo, pobre persistencia (especialmente bajo condiciones tropicales) y su baja eficacia cuando se compara con los insecticidas químicos (por ejemplo, los basados en toxinas).

Los nematodos entomopatógenos miden alrededor de 0.5 mm de largo. Los estadios juveniles parasitan a sus hospedantes, penetrando directamente la cutícula o a través de las aperturas naturales como los espiráculos; las bacterias que se introducen junto con el parásito se multiplican rápidamente y matan al hospedante, permitiendo que los nematodos crezcan y maduren sobre el tejido en descomposición, y convirtiéndose posteriormente en adultos. Después de una a dos semanas posteriores a la invasión del hospedante, aparece una nueva generación de estadios infectivos (Kaya y Gaugler, 1993). Existen dos familias, la Sterneinematidae y la Heterorhabditidae que son parásitos obligados de insectos y que son la base de varios plaguicidas biológicos diseñados específicamente para su uso en contra de plagas del suelo como los gorgojos y las larvas de mosca; a pesar de ello, ambos presentan desventajas debido a su alto costo, baja persistencia e inactividad a bajas temperaturas (en el caso de los nematodos).

A pesar del éxito limitado de hongos y nematodos entomopatógenos como productos biocidas, éstos aparentemente son componentes diversos y universales de las biotas del suelo, en donde pueden ser excepcionalmente virulentos (o decir, causar la muerte rápida del hospedante y provocar grandes niveles de mortandad en las poblaciones de éste) y causar epizootias periódicas (Chandler *et al.*, 1997; Myers y Rothman, 1995). La mayoría de los patógenos poseen una estrategia de transmisión de "sentar y esperar" (*sensu* Ewald, 1995): los organismos producen fases infectivas que son liberadas al ambiente cuando muere el hospedante

y tienen la capacidad de entrar en un estado de letargo o diapausa y permanecer latentes hasta que haya nuevos hospedantes disponibles. Esta capacidad es una adaptación a sus hospedantes artrópodos que son más grandes y con patrones de distribución en parches, lo que les permite mayor distribución geográfica de la población y alta movilidad. Las fases de diapausa y latencia reducen la dependencia en la movilidad de su hospedante y pueden complementarse con la capacidad para vivir saprotróficamente en suelo, aunque su eficiencia competitiva en comparación con otros saprotrofos de vida libre puede ser baja. Aunque los artrópodos que viven por encima del suelo, como los que habitan debajo de éste, son susceptibles a hongos y nematodos, el suelo es, sin duda, el reservorio de las fases infectivas, debido a que ofrece un microambiente estable con una estructura de poros favorable para nematodos y recursos orgánicos para hongos. Con frecuencia no hay correlación entre la densidad del hospedante y la ocurrencia de la enfermedad, sugiriendo de nuevo que los patógenos se distribuyen ampliamente en el suelo. En el caso de los hongos entomopatógenos esto se apoya en evidencia molecular que muestra que poblaciones en suelo no son totalmente clonales, ello a pesar de la ausencia de fases sexuales manifiestas y que el significativo flujo de genes ocurre localmente (Bidochka *et al.*, 2001).

BIOLOGÍA DE HONGOS Y NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Hongos

Los hongos son microorganismos unicelulares (levaduras) o multicelulares (especies filamentosas), que constan de células alargadas provistas de una pared que contiene celulosa y quitina, además de otros carbohidratos y proteínas. Estas estructuras vegetativas son llamadas hifas. Después de la infección exitosa de un hospedante, se producen asexualmente estructuras reproductivas conocidas como esporas o conidias que ayudan a la diseminación del patógeno. Los hongos poseen una gran variabilidad genética y un amplio rango de hospedantes. Los hongos de mayor interés por su potencial como patógenos de insectos son: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, *Nomuraea rileyi*, *Lecanicillium lecanii*, *Hirsutella thompsonii*, *Aschersonia aleyrodis*, *Paecilomyces* spp., *Cordyceps* spp., y hongos del orden Entomophthorales (*Zoophthora*, *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Neozygites*).

Nematodos

Los nematodos entomopatógenos son organismos pseudocelomados vermiformes muy similares a los que parasitan plantas y que pueden asociarse con los insectos de tres formas: forecia (adherencia pasiva y transporte), parasitismo obligado y parasitismo facultativo. Por lo general, los nematodos entomopatógenos presentan una estrecha asociación (simbiosis) con bacterias específicas, las cuales son los agentes primarios que inician la infección en el hospedante. Los nematodos transportan internamente bacterias específicas que son liberadas en el interior del cuerpo del insecto después de que el nematodo penetra a través de aberturas naturales como boca, espiráculos y ano. Estas bacterias se multiplican dentro del insecto y lo matan al causarle septicemia (infección generalizada). Los principales grupos de nematodos de interés pertenecen al orden Rhabditida, y dentro de éste a las familias Steinernematidae y Heterorhabditidae.

La identificación correcta de un agente entomopatógeno, en el caso de los hongos, se basa en caracteres morfológicos del organismo en cultivo y en la estructura de los conidióforos y conidias; en el caso de los nematodos, la identificación se fundamenta en medidas hechas a partir de estructuras presentes en los estadios juveniles infectivos. Sin embargo, para lograr una buena identificación es necesario aislar el microorganismo en cultivos puros o al menos, aislar poblaciones. La población microbiana en cualquier ambiente natural es muy grande y por lo tanto, cuando un insecto muerto es recogido para el cultivo de inóculo infectivo, es muy común encontrar también hongos, bacterias y otros microorganismos saprotróficos que no tienen potencial como agentes específicos para el control de plagas. De igual manera, cuando el objetivo del muestreo es evaluar la biodiversidad (por ejemplo, en el suelo), también pueden obtenerse resultados semejantes y se requerirá de medidas adicionales para identificar patógenos con potencial.

A continuación se describen dos técnicas básicas para el aislamiento de hongos y nematodos entomopatógenos a partir de muestras del suelo.

METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (CHASE ET AL., 1986; LIUD ET AL., 1993; ALVES ET AL., 1998A)

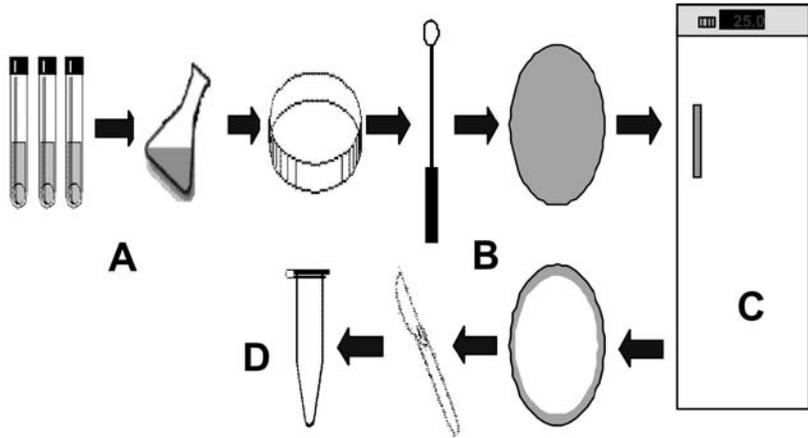
Las muestras de suelo se colectan a una profundidad de 0 a 20 cm y se colocan en bolsas de plástico debidamente etiquetadas. En cada sitio de muestreo,

se toma una muestra compuesta a partir de seis submuestras tomadas en puntos localizados alrededor de un monolito central (véase Capítulo 2). Estas muestras pueden tomarse mediante el método de extracción de núcleos (véase Capítulo 4: Mesofauna), aunque puede prescindirse de él. En el laboratorio se debe mezclar muy bien la muestra compuesta y tomarse alícuotas de 1g de suelo. A partir de estas alícuotas se preparan diluciones 10^{-1} sucesivamente, utilizando agua destilada esterilizada hasta alcanzar una dilución 10^{-4} . De las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se toman 0.1ml y se colocan en medio de cultivo selectivo (el cual contiene el fungicida dodina) y en medio ADP (Agar-Dextrosa-Papa). El medio selectivo de dodina se prepara de la siguiente manera: 20 g de harina de avena + 1 litro de agua destilada; se esteriliza durante 20 minutos a 120°C y se filtra; se añade agua destilada hasta alcanzar el volumen original de 1 litro y posteriormente se añaden 20 g de agar, 550 mg de dodina (N-dodecilguanidina acetato), 5.0 mg de tetraciclina y 10 mg de cristal violeta. El medio ADP se prepara de la siguiente manera: 15 g de agar, 20 g de dextrosa, 200 g infusión de papa (preparada a partir de papas rebanadas y hervidas para extraer el almidón), y agua destilada hasta completar el volumen total de un litro.

El fungicida dodina se añade en pequeñas concentraciones (cerca de 10 mg ml^{-1}) al medio selectivo con el fin de aislar hongos entomopatógenos a partir del suelo y preservar los aislamientos menos susceptibles al fungicida.

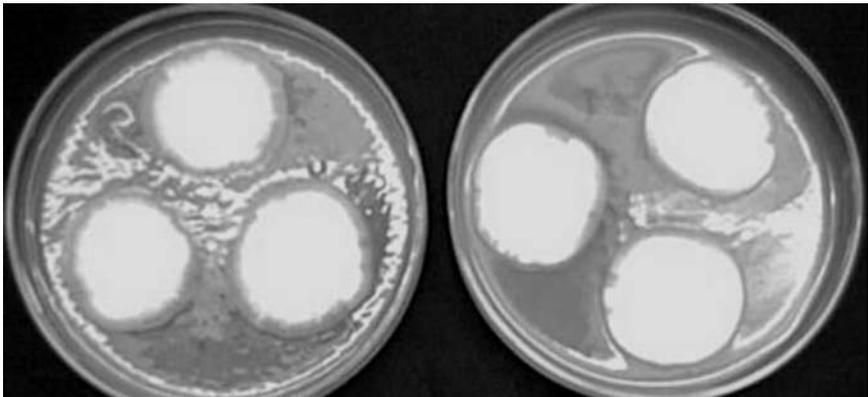
Esto suele ser efectivo especialmente con *Metarhizium anisopliae*. Después de este paso se toman 0.1 ml de la última dilución y se colocan sobre la superficie del medio de cultivo contenido en una caja Petri; el volumen añadido se reparte sobre la superficie utilizando una asa de Drigalski (ya sea de acero inoxidable o vidrio). Las cajas se incuban a 27°C (Figura 10.1). El crecimiento de los hongos y su esporulación se evalúan de 7 a 15 días posteriores a la inoculación. Después de la incubación, la identificación de los cultivos de interés (principalmente *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces* spp.) puede llevarse a cabo usando un microscopio compuesto y claves de identificación basadas en caracteres morfológicos de las estructuras reproductivas, tales como conidióforos, conidias y fálides (Alves *et al.*, 1998b; Samson *et al.*, 1998), con la subsecuente purificación de los cultivos (Figura 10.2) y almacenaje de conidios en condiciones de congelación utilizando tubos *Eppendorf* para tal fin.

Figura 10.1 Procedimiento de aislamiento de hongos entomopatógenos en medios de cultivo a) dilución seriada de la suspensión acuosa que contiene al hongo; b) inoculación de la suspensión (alícuota de 0.1 ml) en una caja petri con medio de cultivo; c) incubación bajo condiciones controladas en una cámara DBO; d) almacenaje de conidios en tubos Eppendorf, bajo condiciones de congelación.



Nota: la separación de contaminantes se logra recogiendo una pequeña porción de cualquiera de las colonias del hongo de interés con una aguja, y transfiriéndola a una caja Petri nueva con medio de cultivo ADP (tres puntos de inoculación por caja).

Figura 10.2 Cultivos purificados de *Beauveria bassiana*, creciendo en medio ADP.



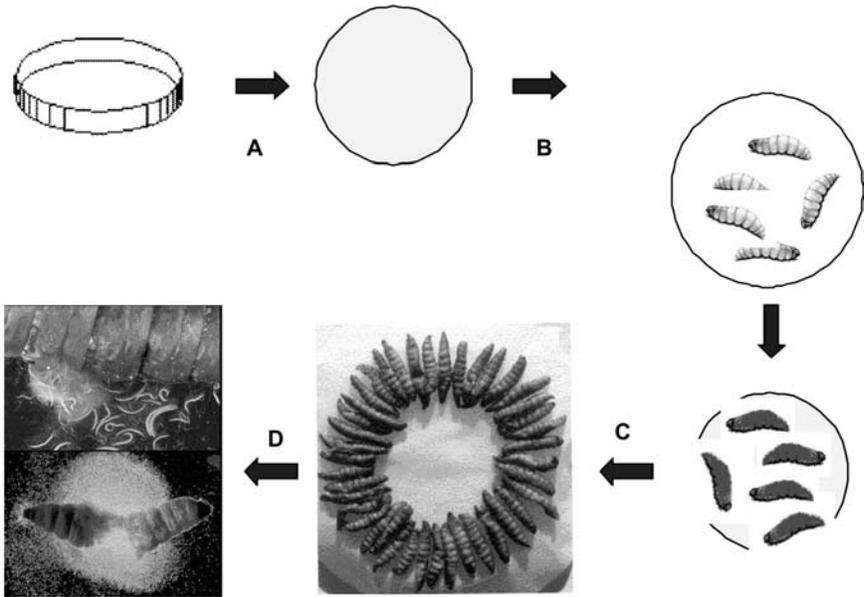
METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO DE NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS (BEDDING Y ARKHURST, 1974)

Se recogen las muestras de la misma forma que fue descrita anteriormente. La detección de nematodos se lleva a cabo mediante bioensayos, utilizando la técnica de trampas de insectos con cinco larvas de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae). Las larvas de este lepidóptero son conocidas como *mealworms* (o gusanos de la harina), y pueden adquirirse comercialmente. Las larvas se colocan en cajas de plástico de 500 ml, que contienen las muestras de suelo y se mantienen cerradas a 23°C en oscuridad. La mortandad de las larvas se evalúa después de cinco a siete días. Las larvas muertas se colocan en una trampa *White* (Chen *et al.*, 2004; Figura 10.3) para coleccionar los estadios juveniles infectivos a partir de los cuerpos muertos. Una trampa de *White* se puede construir utilizando dos cajas Petri: una caja de 5 cm de diámetro se coloca invertida dentro de una caja de 9 cm que contiene agua esterilizada o medio "S" esterilizado y cubierta con un círculo de papel filtro de 9 cm, el cual cae hasta tocar el líquido en el borde de la caja inferior. Las larvas de insectos infectadas se colocan en el centro del papel filtro.

El medio "S" consiste en un litro de solución madre (0.1M NaCl, 0.05M KH_2PO_4 , pH 6.0, 1 μM colesterol) a la que se le añaden 26 ml de una solución nutritiva fresca que contiene citrato de K 0.4M, CaCl_2 0.4M, MgSO_4 0.3M, Na EDTA 0.6mM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1mM, CuSO_4 0 1 μM .

Después de dos días, si se encuentran estados infectivos en el líquido, éstos deben colectarse y colocarse en agua destilada dentro de un frasco *Becker*. La suspensión se deja reposar para permitir que los nematodos queden en el fondo. Posteriormente, la suspensión se lava adicionando una solución de formaldehído (1%) o solución de *Ringer* para obtener una concentración final de 10.000 estados infectivos ml^{-1} . Los nematodos se almacenan en envases cerrados de 50 ml a 11°C o cercano a esa temperatura. La identificación se lleva a cabo con base en las claves específicas de identificación para cada familia de nematodos (*Steinernematidae* y *Heterorhabditidae*) (Alves *et al.*, 1998b; Adams y Nguyen, 2002). Los ejemplares de nuevas especies pueden someterse a un análisis molecular para así comparar los patrones de DNA.

Figura 10.3 Procedimiento para el uso de la trampa White para el aislamiento de nematodos entomopatógenos: a) caja Petri con papel filtro (Cámara seca); b) larvas de *Galeria mellonella* muertas después del contacto con la muestra de suelo; c) larvas que muestran la patología típica de infección por nematodos; d) emergencia de juveniles infectivos en la trampa White. Fotos: R. Gaugler.



REFERENCIAS

- Adams, B. J. y Nguyen, K. B. (2002) 'Taxonomy and Systematics', in R. Gaugler (ed) Entomopathogenic Nematology, CAB International, Wallingford.
- Alves, S. B., Almeida, J. E. M., Moino Junior, A. y Alves, L. F. A. (1998a) "Técnicas de laboratório", in S. B. Alves (ed) Controle Microbiano de Insetos, 2nd edition, FEALQ, Piracicaba Brazil.
- Alves, S. B., Ferraz, L. C. C. B. y Castello Branco Jr, A. (1998b) "Chaves para identificação de patógenos de insetos", in S. B. Alves (ed) Controle Microbiano de Insetos, 2nd edition, FEALQ, Piracicaba Brazil.
- Bedding, R. A. y Akhurst, R. J. (1974) 'A simple technique for the detection of insect parasitic nematodes in soil', Nematologica, vol. 21, pp. 109–110.
- Bidochka, M. J., Kamp, A. M., Lavender, T. M., Deckoning, J. y De Croos, J. N. A. (2001) 'Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhi-*

- zium anisopiliae: Uncovering cryptic species', *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, pp. 1335–1342.
- Chase, A. R. L., Osborne, S. y Ferguson, V. M. (1986) 'Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium', *Florida Entomologist*, vol. 69, pp. 285–292.
- Chandler, D., Hay, D. y Read, A.P. (1997) 'Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils', *Applied Soil Ecology*, vol. 5, pp. 133–141.
- Chen, Z. X., Chen, S. Y. y Dickson, D. W. (2004) *Nematology, Advances and Perspectives*, CAB International, Wallingford.
- Ewald, P. W. (1995) 'The evolution of virulence: A unifying link between parasitology and ecology', *Journal of Parasitology*, vol. 81, pp. 659–669.
- Groombridge, B. (ed) (1992) *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources*, World Conservation Monitoring Centre, Chapman and Hall, London.
- Hajek, A. E. y St. Leger, R. J. (1994) 'Interactions between fungal pathogens and insect hosts', *Annual Review of Entomology*, vol. 39, pp. 293–322.
- Kaya, H. K. y Gaugler, R. (1993) 'Entomopathogenic nematodes', *Annual Review of Entomology*, vol. 38, pp. 181–206.
- Liu, Z. Y., Milner, R. J., McRae, C. F. y Lutton, G. G. (1993) 'The use of Dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium* spp. from soil', *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 62, pp. 248–251.
- Meyers, J. H. y Rothman, L. E. (1995) 'Virulence and transmission of infectious diseases in humans and insects: Evolutionary and demographic patterns', *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 10, pp. 194–198.
- Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E. y Pell, J. K. (2006) 'Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts', *Annual Review of Entomology*, vol. 51, pp. 331–357.
- Samson, R. A., Evans, H. C. y Latgé, J. P. (1988) *Atlas for Entomopathogenic Fungi*, Springer-Verlag, New York.

CAPÍTULO 11

Descripción y clasificación de uso de suelo en puntos de muestreo para elaborar un inventario de la biodiversidad del suelo

E. Jeroen Huising

RESUMEN DE LA METODOLOGÍA PARA LA DESCRIPCIÓN DE USO DE SUELO

Este capítulo muestra una lista estructurada de atributos de uso de suelo que sirve como guía para la observación de características de uso de suelo en el campo, en los puntos de muestreo. Este método ofrece varios niveles de detalle que describen las características, dependiendo de los datos disponibles. En la mayoría de los casos, los dominios de los valores de los atributos se especifican, lo cual requiere solamente el valor adecuado por evaluar en el campo. Esto se lleva a cabo mediante la observación directa, entrevistas o preguntas. Solamente en algunos casos, cuando se precise un alto nivel de detalle, se necesitarán mediciones reales. La clasificación de uso de suelo se facilita por una estructura jerárquica donde se ordenan los atributos, pero las clases finales de uso de suelo dependerán de la selección de dichos atributos a considerar para la clasificación, en función del propósito y del contexto de la clasificación misma. Cuántas clases de uso de suelo pueden ser definidas con respecto a la intensidad de usos de suelo se ilustra a continuación.

ANTECEDENTES Y PRINCIPIOS DE DISEÑO

Propósito de la clasificación del uso de suelo y de su cobertura vegetal

El uso de suelo, y en particular la intensidad de su uso, se considera uno de los factores determinantes de la abundancia y riqueza de poblaciones de organismos del suelo, y es por lo tanto, la hipótesis central del proyecto CSM-BGBD (Giller *et al.*, 2005). Para comprobar esta hipótesis, se requiere de un sistema que permita el registro de las características de uso de suelo en las parcelas de muestreo y su clasificación posterior, a través de puntos de referencia de los países tropicales involucrados. Este capítulo presenta una estructura que provee el registro sistemático de las características de uso de suelo, y al mismo tiempo, proporciona una estructura para la clasificación de usos de suelo. Dicha estructura necesita ser flexible, en cuanto al uso de varios recursos como fotos aéreas o imágenes satelitales para el propósito de la clasificación, de manera que se puedan definir las clases de uso de suelo, basadas en un común denominador en todas las áreas bajo estudio. Lo último, implica que las clases de uso de suelo no están definidas *a priori*, pero dependen de los clasificadores o atributos seleccionados para la asignación de la clase de usos de suelo a cualquier observación particular, de modo que se puedan reflejar las diferencias en la intensidad de uso de suelo.

Los procesos dominantes que determinan la presencia e incidencia de la biota del suelo y la escala espacial donde éstos se manifiestan no se conocen completamente, razón por la cual fue adoptado un sistema regular en cuadrícula para muestrear la biodiversidad del suelo con un inventario detallado de su uso y cobertura en los lugares de muestreo, lo que facilita el análisis de los factores determinantes actuales y una clasificación *a posteriori*. Las clases de uso de suelo predefinidas no son necesariamente aplicables o relevantes para todas las áreas involucradas porque será muy difícil definir un grupo estándar de clases de usos de suelo, dada la variación en los cultivos y sus posibles combinaciones, la historia de uso de suelo y las prácticas de manejo de los mismos, especialmente en las regiones tropicales. La idea general es que el contenido de un estudio depende de la naturaleza de la región (Vink, 1975). En lugar de utilizar clases predefinidas de uso de suelo, el enfoque que se describe a continuación se aleja de la idea de que las clases de uso de suelo sean definidas de acuerdo con la identificación de las características relevantes de uso de suelo (atributos) que permiten una

discriminación entre clases de usos de suelo. Las clases de usos de suelo obtenidas de esta manera pueden ser utilizadas para la extrapolación de los resultados más allá de los lugares de estudio.

La descripción detallada de uso y la cobertura de suelo deberán formar parte del inventario. El sistema de clasificación de uso y cobertura del suelo ayuda a la armonización de los procedimientos para la recolección de datos y al manejo de los mismos. El objetivo del inventario para proveer datos que permitan evaluar cambios en la biodiversidad del suelo en relación con el uso del suelo, especialmente en su intensidad, es diferente al monitoreo usado con frecuencia que incluye en la descripción de uso de suelo y el estudio de las condiciones naturales y socioeconómicas del suelo como un primer objetivo (Vink, 1975). Lo anterior, generalmente se traduce en el registro de la ocurrencia de cultivos. No obstante, para el propósito actual, los fenómenos relacionados con la forma en que se está utilizando el suelo (p. ej. el manejo de los cultivos y del suelo) son de particular importancia porque impactarán notablemente sobre la distribución de los organismos del suelo. Un segundo objetivo para los inventarios de uso de suelo es proveer información básica para definir los usos de suelo alternativos y las prácticas de manejo que mejoran la sustentabilidad de la producción agrícola y conservan la biodiversidad del suelo.

Los objetivos mencionados arriba fueron también citados en el programa Africover, que desarrollaron el Sistema de Clasificación de Cobertura de Suelo (LCCS) por Di Gregorio y Jansen (2000). El enfoque del inventario de uso de suelo aquí descrito se apoya principalmente en ese sistema de clasificación, aunque contiene elementos añadidos relacionados con el manejo de suelo y cultivos. Asimismo, los métodos descritos en este capítulo se aplican únicamente en paisajes agrícolas terrestres (p. ej. áreas cultivadas y manejadas) mientras que el marco del LCCS incluye sistemas terrestres vegetales (semi) naturales, sistemas acuáticos y principalmente áreas sin vegetación. Para la clasificación y descripción de las áreas de vegetación (semi) natural se puede seguir el LCCS. La estructura de las descripciones del uso de suelo actual no ha sido hecha para registrar el uso de suelo histórico. El método no incluye una estructura para la descripción de los atributos ambientales, como clima, forma del paisaje, etc., aunque atributos relacionados con la historia del uso de suelo o condiciones ambientales podrían ser adicionados o modificados del sistema de clasificación.

El método que se presenta pretende ser de utilidad para la descripción de uso de suelo a nivel parcela, sin incluir elementos relacionados con el manejo de gana-

do, porque esto no está particularmente relacionado a nivel de parcela, ni incluye elementos relacionados con el sistema de cultivo; aunque se reconoce que para los estudios a una escala mayor o para considerar opciones alternativas de uso de suelo, resultarían de gran utilidad. El método que se describe a continuación, por lo tanto, no resulta apropiado para la descripción y mapeo de áreas más grandes, a no ser la cobertura del suelo *per se*.

CONCEPTO Y PRINCIPIOS DE DISEÑO

Los conceptos y principios de diseño del LCCS adoptados utilizan criterios diagnósticos ordenados de manera jerárquica para permitir un sistema de clasificación consistente con límites claros para las clases. Muchos sistemas de clasificación utilizan *a priori* definiciones descriptivas de uso de suelo y clases de cobertura del suelo, dispuestos en un sistema jerárquico, donde cada jerarquía se relaciona con diferentes niveles de detalle temático y espacial. Obsérvese, por ejemplo, el sistema de clasificación de uso de suelo y de su cobertura del *US Geological Survey*, descrita por Lillesand y Kiefer (1987), basada en la interpretación de fotografías aéreas con el propósito de elaborar mapas de uso y cobertura del suelo. Estos “sistemas” de clasificación básicamente representan leyendas. Dicho sistema a menudo carece de una definición clara de los límites de clases, son rígidos y de capacidad limitada para incorporar nuevas clases, por lo tanto, no son exhaustivos (es decir, representan un subconjunto de un rango de posibles usos y coberturas de suelo) y debido a que no existe un sistema de clasificación de referencia, son limitados cuando se les compara con otros sistemas.

El principio básico se apoya en el uso de clasificadores que refieren a criterios de diagnósticos o atributos independientes. La jerarquía de clases es construida sobre un conjunto de clasificadores, utilizados para definir una clase. Cuantos más clasificadores se añaden, más detallado queda el nivel de clasificación. Existen cinco niveles en la jerarquía de clasificación:

Nivel 1: Características relacionadas principalmente con el cultivo y el campo

Nivel 2: Características relacionadas con la combinación de cultivos.

Nivel 3: Características relacionadas con aspectos culturales como irrigación y cultivo de temporada.

Nivel 4: Características relacionadas con el manejo de prácticas del suelo.

Nivel 5: Características de uso de suelo del área directamente circundante a

la parcela de muestreo, especialmente en relación con elementos leñosos de la vegetación que no se reconocen como cultivo y en relación con cultivos en campos adyacentes, incluyendo arreglos espaciales de los campos agrícolas.

Por ejemplo, la clase mayor es definida por el tipo de cultivo principal (p. ej. "cultivo de árboles" para un sistema basado en árboles), junto con el tamaño de las áreas de los campos. El tamaño del campo generalmente es indicador del tamaño de la finca, que muchas veces es referencia de la clase social y del tipo de manejo (Huising, 1993). Las subclases pueden definirse basándose en otros cultivos que forman parte del sistema del cultivo general. Esto puede ser señal de cultivos simultáneos o, en secuencia. Las características de rotación de cultivos se consideran en otros estudios. En el siguiente nivel de la clasificación jerárquica se consideran las prácticas culturales relacionadas con el suministro de agua y factores de cultivos de temporada. Este último determina si el campo forma parte de un sistema de cultivo migratorio, un sistema de barbecho o un sistema de cultivo permanente. Estos tres primeros niveles forman la base para la clasificación de uso de suelo y la colecta de datos en relación con dichas características se sugiere representan los datos mínimos requeridos. Asimismo, se han añadido clasificadores que relacionan el manejo del suelo y cultivos que permiten la determinación del nivel de intensidad de uso. Dichos clasificadores, normalmente, se refieren a las operaciones realizadas en una parcela en particular, tales como la preparación del suelo, el deshierbe y la fertilización del mismo. Las características no siempre son fácilmente observables, pero con algunos antecedentes de uso de suelo y de los sistemas de cultivo habituales, o basados en los datos proporcionados por el agricultor, éstos pueden ser evaluados.

El quinto nivel en los sistemas de clasificación se relaciona con elementos de vegetación leñosa (semi) permanentes dentro de la parcela y en los campos aledaños; son características que no se evalúan en los primeros niveles de clasificación, pero que se consideran importantes en relación a la intensidad del uso y pueden tener un impacto directo sobre la biodiversidad del suelo. Estos elementos de vegetación se relacionan con características permanentes en el paisaje, como setos, cercas vivas, barreras de viento y otras estructuras semipermanentes.

Otros aspectos que se deben considerar son la distribución, el manejo de los campos agrícolas (es decir, patrones de campo) y los cultivos asociados. Esta información puede ayudar a determinar si la parcela bajo consideración representa una característica (o patrones) del uso de suelo o tipo de cobertura, lo que sirve para

identificar posibles asociaciones de usos de suelo que, a su vez, sirven para trazar la cartografía del uso de suelo (mediante la interpolación de puntos de observación que complementan un mapa). Además, el patrón del campo ofrece información sobre la fragmentación del suelo y constituye otro aspecto de la intensidad de uso de suelo que puede impactar directamente sobre la biodiversidad del suelo.

Los niveles de clasificación definen un eje de la clasificación jerárquica en donde atributos adicionales (conjuntos de ellos) en cada nivel subsecuente definen las subclases (que representan un mayor nivel de detalle). Estos nuevos atributos ofrecen información más específica sobre el objeto de observación. Además de este eje existe uno más en la clasificación jerárquica que hace referencia al nivel de precisión con que se describen las características de uso o añade información específica (detalles técnicos) de las características de uso de suelo descritas. Los atributos, por lo tanto, no son independientes y pueden involucrar algún tipo de medición con un nivel más alto de detalle; por ejemplo, el cultivo principal se puede describir como maíz (*Zea mays*); información más específica se remite a variedades y esto representaría un mayor nivel de detalle (especificidad). Por otro lado, el cultivo principal puede describirse a un nivel más general (de género) como *Zea* o a un nivel de familia como Gramineae (pastos). Si se conoce el valor de clase a un nivel más específico, el valor de clase a un nivel más detallado de generalización puede ser inferido. Estos atributos técnicos específicos, como los refiere el LCCS, pueden añadirse sin mayores consecuencias para el sistema de clasificación. Los atributos técnicos específicos permiten una definición más precisa de clases de uso de suelo asociados, que pueden incluir, por ejemplo, la descripción cuantitativa de la intensidad del uso del suelo. Los principios de las clasificaciones jerárquicas son explicados por Molenaar (1991, 1998) y Huising (1993).

Registro de datos en campo y observaciones adicionales

En las siguientes secciones se presenta la lista de atributos para la descripción de usos de suelo. Éstas sirven para guiar las observaciones en el campo en los puntos de muestreo y sus áreas circundantes, por lo tanto, son consideradas observaciones a nivel de parcela. La transformación de las listas de atributos a formatos para registrar los datos en el campo resulta fácil. Los valores de datos posibles (dominios de valor) para la mayoría de los atributos son dados para proporcionar una descripción estándar de las características de uso de suelo. En el caso de algunos de estos atributos, los dominios de valor no son específicos para permitir la definición de

valores de datos en los rangos de observación y distribución de los valores de datos. Las clases de datos deben indicar una discriminación relevante (significativa) de objetos y el subconjunto de clases debe ser extensivo (no exclusivo). *A priori*, clases de tamaño estándar definidas en campo con límites fijos no podrán ser significativas por esa razón. Los atributos pueden agregarse para facilitar la descripción de características específicas de un área en particular, pero éstos deberán añadirse a los niveles más bajos de la clasificación jerárquica para evitar que interfieran con la estructura de la misma.

Las observaciones para los tres primeros niveles del sistema de clasificación se pueden hacer directamente en el campo, junto con la información relacionada con el tercer nivel (es decir, características culturales) obtenida de un informante o derivada de la información general de las prácticas culturales en el área. La información en el cuarto nivel, relacionada con el manejo, no se obtiene a través de observaciones directas en el campo, sino que requiere del acceso a fuentes adicionales de información (a través de entrevistas a los agricultores, a personas externas, o bien, utilizando otros recursos, como documentos). Sin embargo, con los conocimientos de un sistema habitual de cultivo y las prácticas de manejo en el área, se debería poder inferir información sobre el manejo de la parcela en particular, simplemente, a partir de la observación directa en el campo.

La información de estas fuentes de datos puede resultar incorrecta, pero ello se compensa con la aplicación de la jerarquía en la precisión de los datos (referidos anteriormente como el segundo eje en el sistema de clasificación). Por ejemplo, si la información sobre la tasa de aplicación de un fertilizante inorgánico en particular no se considera confiable o correcta, es aceptable clasificar la tasa de aplicación como baja, media o alta; basados en la definición de la clase adoptada (ver Tabla 11.6b). Si éste no es el caso, la información puede generalizarse para la clase de "fertilizante aplicado" (implicando el uso de fertilizante inorgánico). La situación contraria sería con el conocimiento de la práctica común en el área, basada en observaciones secundarias, una tasa particular de aplicación (baja, media o alta) puede ser asumida.

El sistema para describir el uso de suelo muestra varios niveles de detalle. A menudo, los datos relacionados con niveles muy detallados de observación son muy difíciles de obtener, o bien, sus fuentes no son totalmente confiables. Sin embargo, esto no es prescriptivo en el sentido de que los datos necesitan ser colectados en todos los niveles de detalle. El nivel de detalle al cual la información es reunida depende del propósito del inventario de uso de suelo y de la posibilidad de obtener

la información requerida. El sistema para la descripción de uso de suelo requiere de una estructura que pueda implementarse a detalle y que se considere viable bajo las condiciones reales.

Observaciones secundarias pueden relacionarse con el estatus del cultivo o con la presencia de maleza. Estas observaciones no se consideran como clasificadores y, por lo tanto, no se incluyen en las listas de atributos que se detallan a continuación; sin embargo, pueden ser incorporadas fácilmente a las libretas de campo en caso necesario, dependiendo de la experiencia del encargado del proyecto. Se recomienda revisar el trabajo de Stocking y Murnaghan (2001) para los indicadores relevantes de observaciones en el campo. Estas observaciones secundarias sirven, al mismo tiempo, como un mecanismo para la validación de los datos en atributos y clasificadores e incluso para los resultados de clasificación finales. El hecho de que el encargado del proyecto se encuentre familiarizado con el uso de suelo y con las prácticas de manejo en el área, será siempre una ventaja.

Se deberá registrar la localización específica del punto de muestreo dentro del campo (por ejemplo, el centro o los linderos). El uso de una cuadrícula regular para el muestreo permite que se tomen puntos de muestreo en cualquier lugar dentro de la parcela y posibles efectos de borde deben tomarse en cuenta. Para este propósito, la información sobre el tipo de lindero se debe registrar, ya que puede tener un efecto en la distribución de la biodiversidad del suelo. Si bien estas observaciones no se incluyen en la clasificación del uso de suelo, sí pueden aportar información para el análisis de datos, (por ejemplo, la explicación de posibles datos atípicos). Este tipo de información deberá registrarse en la libreta de campo, además de los datos administrativos como hora, fecha, nombre del encargado del proyecto y nombre de la persona que toma los datos.

OBSERVACIONES DE USO DE SUELO: CLASIFICADORES Y ATRIBUTOS

Observaciones respecto del cultivo principal y tamaño del campo

El primer nivel del sistema de clasificación se reserva para las observaciones del cultivo principal, como el elemento de vegetación más dominante; el segundo, para la selección entre un cultivo de árboles y un cultivo anual en el mismo campo, donde el cultivo de árboles se considera como el principal, siempre y cuando la cobertura del suelo no se clasifique como escasa; la cobertura del dosel deberá clasificarse como "abierta" o "cerrada". Si la selección se realiza entre dos

o más cultivos de la misma forma de vida, el cultivo con el mayor porcentaje de cobertura califica como el cultivo principal. Se prevé para una descripción de un segundo y tercer cultivo.

La clasificación se basa en la forma de vida del cultivo. En la Tabla 11.1 los valores posibles (clasificadores o atributos) se enlistan entre corchetes. Los atributos técnicos son específicos para cada una de las diferentes formas de vida, proporcionando una mayor especificación de la forma de vida a nivel de detalle. En el caso de un cultivo de árboles o arbustos se puede añadir información sobre el aspecto (es decir, el propósito) y duración del cultivo, porque su apariencia (características de vegetación) puede ser muy distinta, dependiendo, por ejemplo, de la edad de la plantación. En el caso de cultivos herbáceos, una especificación con más detalle indica si el cultivo pertenece a la categoría de “raíces o tubérculos”, “leguminosas o vegetales”, “forrajes o fibras”. La información más concreta sería entonces el tipo específico de cultivo. La categoría de cultivo herbáceo representa un nivel adicional en la clasificación jerárquica (nivel de especificación) y, por lo tanto, no se enlista bajo el título “Atributos técnicos 1” en la Tabla 11.1. Cuando se considera relevante, se puede añadir un cuarto nivel que ofrezca información sobre la variedad específica del cultivo. Generalmente, es conocido el tipo de cultivo. El valor de dominio no se especifica aquí, pero en lugar de dejarlo abierto, es mejor definir una lista de

Tabla 11.1 Clasificadores y atributos técnicos para el cultivo principal

Nivel 1a – Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Forma de vida [árbol, arbusto, hierba, o gramíneas]	Cultivo de árboles o arbusto	Tipo de cultivo (especies y variedades)
	Fenología de la hoja [siempre verde; decíduo]	
	Tipo de hoja [aguda; ancha]	
	Propósito [vivero; cosecha de frutas, nueces y otros; cosecha de toda la planta (p. ej. para madera o leña), árboles de sombra]	
	Duración del cultivo [Estación (parte del año); 1 año; entre 1 y 3 años; entre 3 – 10 años; más de 10 años]	

Tabla 11.1 Continúa

Nivel 1a – Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
	Gramíneas	
	Tipo [bambú, cereales, arroz, caña, pastos]	Tipo de cultivo (especies o variedades)
	Sí no son gramíneas	
	Categoría del cultivo [I- herbáceas, II- plátanos y otras plantas herbáceas arbóreas, III-cultivos de cobertura, IV- lúpulo y otras enredaderas perennes]	Tipo de cultivo
	Herbáceas Categoría de cultivos [raíces y tubérculos, legumbres y vegetales, forrajes, fibras] (si se conoce, especificar el tipo de cultivo)	Tipo de cultivo

nombres permitidos para los tipos de cultivo, con el propósito de evitar cualquier confusión; no obstante, ésta queda fuera del marco de este capítulo; a manera de ejemplo, véase la lista LCCS (Di Gregorio y Janssen, 2000).

El siguiente nivel en la clasificación jerárquica se determina por las características espaciales de la parcela en observación (Tabla 11.2). La definición de clases de tamaño de campo “pequeña”, “mediana” o “grande” no aparece, puesto que ello dependerá del contexto de estudio; es mejor definir clases significativas basadas en un estudio piloto del rango de tamaño de campo presentes en el área de estudio (Huisling, 1993) con la opción de utilizar diferentes definiciones para cada una de las distintas regiones en donde se esté llevando a cabo el estudio, pero manteniendo la distinción conceptual entre pequeño, mediano y grande. La forma del campo se añade principalmente como una preocupación respecto a posibles efectos de borde y, además, sirve como indicador del grado de organización y mecanización de las prácticas de manejo. Aquí se incluye la “cobertura de los cultivos”, aunque esto se relaciona más con las características del cultivo que, con las características de campo. La cobertura del cultivo se anexa aquí, aunque está más relacionada con las características del cultivo que con las características del campo. La cobertura del cultivo se usa generalmente como un parámetro para la interpretación de

imágenes de percepción remota. Esto puede servir para entender la importancia relativa del cultivo en sistemas de cultivos múltiples, en los casos donde un clasificador de segundo nivel “combinación de cultivos” indica que existe un segundo o tercer cultivo creciendo en el campo. Además, proporciona información acerca de la densidad del cultivo y es un indicador útil de la intensidad del uso de suelo. En el caso de cultivos anuales, la cobertura del cultivo puede resultar difícil de interpretar debido a la variación en la arquitectura de las plantas, a las diferencias en las etapas de crecimiento y otros factores. Por lo tanto, y especialmente en el caso de los cultivos anuales, su densidad puede medirse directamente en términos del número de plantas por unidad de medida (m² o ha) o en términos de espacio entre plantas (el espacio entre surcos y la distancia entre las plantas). Las clases de densidad podrían especificarse, pero dependería mucho del tipo de cultivo. En el caso de formas de vida permanentes, el tipo de cobertura “cerrada”, generalmente, se refiere a que se produce un empalme entre las copas. Una cubierta “abierta” significa que la distancia entre los perímetros de las copas puede ser hasta dos veces mayor que el diámetro medio del dosel. Para coberturas no permanentes, los límites de clases son ligeramente diferentes (ver Di Gregorio y Janssen, 2000).

Tabla 11.2 Tamaño del campo y características de la cobertura del cultivo.

Nivel 1b -Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Tamaño de campo o parcela [chica, mediana, grande]	<p>Forma [cuadrada, rectangular; circular, multiangular, en tira o irregular]</p> <p>Tamaño del campo (metros cuadrados)</p>	<p>Cobertura del cultivo</p> <p>Cobertura no permanente: [alta (> 60%); mediana (60 – 30%); baja (30 -15%)]</p> <p>Cobertura permanente: [cerrada (> 70-60%); abierta (70-60 – 20-10%); escasa (20-10%)]</p>

Observaciones relacionadas a combinación de cultivos y prácticas culturales

Las combinaciones de cultivos se consideran el segundo nivel; esto se refiere a que en una misma parcela y durante una sola temporada se realizan uno o varios cultivos. Se pueden hacer distinciones de acuerdo con el número de cultivos y con su secuencia.

En el caso de un segundo o tercer cultivos, la distribución espacial en el campo puede especificarse. El segundo y tercer cultivo pueden describirse por los mismos

atributos, en los varios niveles de especificación, igual que para el cultivo principal. El segundo tipo de cultivo se añade como un segundo atributo técnico. Un segundo tipo de cultivo puede referirse a un cultivo de sotobosque como el cardamomo, en cuyo caso, no habría un arreglo especial; también en estos casos, la totalidad de su cobertura (es decir, el porcentaje de cobertura del cultivo adicional o añadido) puede alcanzar fácilmente el 100%. La vegetación del sotobosque también puede referirse a vegetación (semi) natural, como por ejemplo, plantaciones, en donde la especificación de la forma de vida, junto con la fenología y tipo de hoja, serían suficientes. El segundo (o tercer) cultivo o elemento de la vegetación puede incorporarse en la descripción de clase del sistema de uso de suelo como elemento descriptivo o como atributo; por ejemplo, los cultivos de árboles (hule) en un campo grande (plantación), con un sotobosque herbáceo cerrado. Es necesario registrar cuando se practica una rotación de cultivo en particular. Se realizan previsiones al tercer nivel de clasificación, relacionadas con el "factor de tiempo del cultivo" para especificar esta información.

El nivel tres en el sistema de clasificación se refiere a las prácticas culturales, definidas como características de suministro de agua y características relacionadas con el barbecho. La descripción para las características del suministro de agua es muy sencilla (ver Tabla 11.4).

Tabla 11.3 Atributos de cultivos cambiando.

Nivel 2 – Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Combinación de cultivos [simple (monocultivo); múltiple (intercalado)]	<i>Cultivos múltiples</i> No. de cultivos adicionales [1; 2 o más] Secuencia [simultáneo, traslapar, secuencial]	(Segundo tipo de cultivo)
		<i>Simultáneo o traslapado</i> Arreglo espacial [una o dos filas intercaladas; franjas alter- nas; fragmentadas o dispersas]

Tabla 11.4 Características del suministro de agua

Nivel 3a – Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Suministro de agua [llu- via; postinundaciones; irrigación]	<i>Irrigación</i> Tipo de irrigación [superfi- cial, aspersión o goteo]	Demanda de agua por irri- gación [mm de agua sumi- nistrada por temporada de crecimiento o cultivo]

El cultivo post inundación se define, de acuerdo con el LCCS, de la siguiente forma: “después de que un campo ha sido inundado con agua de lluvia, la lluvia infiltrada en el suelo se usa intencionalmente como reserva para los cultivos”. Esto es similar, aunque no lo mismo, al empleo de técnicas de cosecha de agua (tratado por separado en la sección relacionada con el manejo de suelos y cultivos).

El factor de tiempo del cultivo indica la fracción de tiempo durante la cual el suelo es usado para el cultivo. Se hace una distinción entre cultivos migratorios, barbechos y cultivos permanentes. El cultivo migratorio se define como suelo cultivado durante menos del 33% del tiempo (Ruthenberg *et al.*, 1980). Los sistemas de barbecho se definen como suelo cultivado entre el 33% y el 66% del tiempo y en los cultivos permanentes, el suelo está cultivado por más de 66% del tiempo. Los atributos técnicos se especifican en la Tabla 11.5.

El barbecho se refiere al periodo (estación de crecimiento) durante el cual se deja descansar el suelo; en principio, se debe hacer la distinción entre si esto se hace con el objetivo de restaurar la fertilidad del suelo o debido a que las condiciones no permiten cultivar (bajas temperaturas o disponibilidad de agua limitada); sin embargo, en términos prácticos, y debido a que no trae consecuencias en la intensidad del uso de suelo, esta distinción no se mantiene.

Los cultivos migratorios típicamente se refieren a situaciones donde los agricultores abren nuevas parcelas para el cultivo, mientras que en el sistema de barbecho

Tabla 11.5 Factor tiempo de cultivo.

Nivel 3b - Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Factor tiempo de cultivo [cultivo migratorio, barbecho, permanente]	Cultivo migratorio Período de barbecho [corto, mediano, o largo plazo]	Índice de cultivo (valor del índice de cultivo Ruthenberg)
	Barbecho Tipo de barbecho [suelo desnudo, natural, mejorado]	Si es mejorado: Tipo de cobertura (ej. Leguminosas, u otro tipo)
	Duración del barbecho [corto, mediano, largo]	Índice de cultivo (valor del índice de cultivo Ruthenberg)
	Permanente Permanente [continuo o intermitente]	Intermitente No. de cultivos en dos años

cultivan la misma parcela o área de suelo, dejándola descansar durante diferentes periodos de tiempo para restaurar la fertilidad del suelo. Bajo la presión de una población en aumento, el periodo de barbecho típicamente tiende a reducirse, por lo tanto, resulta relevante anotar la duración de dicho periodo.

En el caso de cultivos migratorios, se hace una distinción entre la duración del periodo de barbecho:

Barbecho corto, con un periodo de < 1–2 años.

Barbecho medio, con un periodo de > 1–2 años, pero < 8–10 años.

Barbecho largo, con un periodo de > 8–10 años.

Estas son evaluaciones parcialmente cualitativas y, por ello, se sobreponen los límites de clases y se especifican para cubrir la variación específica de un periodo de barbecho para cualquier área que probablemente sea dependiente de las condiciones socioeconómicas y biofísicas habituales. La definición de estos límites de clases se basa en la experiencia en el campo, pero necesita confirmarse y puede ajustarse con base en los datos reales sobre la duración de los periodos de barbecho en el área en cuestión. Para sistemas de barbecho, la clasificación del periodo de barbecho es la siguiente:

Periodo corto: < 4–5 meses.

Periodo medio: 4–5 meses, pero < 8–9 meses.

Periodo largo: > 8–9 meses

El barbecho de periodo corto se refiere a situaciones donde normalmente existen dos temporadas de cultivo en un año y el suelo se deja descansar durante el resto del periodo. El barbecho medio refleja la situación donde el suelo descansa durante seis a siete meses, lo cual es muy común en algunos lugares donde uno o dos cultivos “cortos” ocurren durante un año o donde el agricultor deja un periodo de barbecho más largo, durante el segundo año. El periodo largo de barbecho es la situación típica en donde el suelo se deja en barbecho durante un año o más, pero eso no resulta lo suficientemente largo para clasificarlo como cultivo migratorio.

Los barbechos se consideran como “mejorados” en el momento en que se planta o se siembra para cambiar la composición de la vegetación de barbecho o para mejorar su calidad. No se hace ninguna distinción referida al tipo de cultivo o propósito, por ejemplo, forrajes. Si se requiere de datos más precisos, éstos se pue-

den calcular utilizando el índice de cultivos de Ruthenberg, tal y como se muestra en la siguiente fórmula (Ruthenberg *et al.*, 1980):

$$CI_r = T_c / (T_c + T_f)$$

En donde:

T_c = duración del cultivo (tiempo).

T_f = duración del barbecho o duración del tiempo en el que no se cultiva el suelo.

Hasta este momento no se han considerado las rotaciones de cultivo, por lo que no han sido incluidas en el sistema de clasificación; sin embargo, es un factor que deberá tomarse en cuenta en relación con la biodiversidad del suelo. Si se practica una rotación de cultivos, el mejor momento para incluir una descripción de las secuencias de los cultivos sería en el segundo nivel de la clasificación jerárquica donde “la combinación de cultivos” puede describirse como “secuencial”. De manera alternativa, se podría prever, tal y como se observa en la Tabla 11.5, el “factor tiempo de cultivo”, puesto que el barbecho a menudo forma parte de un sistema de rotación de un cultivo en particular. Los datos deberán especificar el número de años del ciclo de rotación de cultivos y la secuencia de los cultivos en el ciclo.

Características de manejo del suelo y de cultivos

Las prácticas culturales mencionadas incluyen: “manejo de agua” como una operación de manejo; el manejo del suelo y de los cultivos se consideran representativos de un nivel separado en el sistema de clasificación (Tabla 11.6a). Los mayores componentes de las prácticas de manejo discutidas se refieren a técnicas para la preparación del suelo o su cultivo, el manejo de las malas hierbas, plagas y enfermedades, fertilización y cosecha. Se añade la “preparación del suelo” por su relevancia en los márgenes de la selva en los trópicos, donde potencialmente existe un alto impacto en la biodiversidad del suelo.

En cuanto a la preparación del suelo y la cosecha, el principal aspecto que se debe considerar sería si esto se realiza por medios mecánicos o no. Esto es, por lo tanto, una opción para combinar ambos clasificadores dentro de uno que describa el grado de mecanización. Alternativamente, la cosecha, como un clasificador podría ser excluida de la clasificación porque la preparación del suelo es generalmente la

primera operación para ser mecanizada y tiene un profundo efecto en la biodiversidad del suelo. Se hace una distinción basada en si el suelo ha sido labrado o no; en caso afirmativo, se basa en el tipo de tracción utilizada: animal o mecánica. El tipo de animal o el tipo de maquinaria empleada es indicado en el siguiente nivel de detalle, refiriendo su capacidad. Se presume que animales “pesados” o maquinaria pesada causan un mayor impacto en el suelo, comparado con animales “ligeros” o maquinaria de igual consideración, tomando en cuenta el impacto directo del peso del animal o la maquinaria y el impacto generado por los diferentes tipos de equipo operados por maquinaria o animales de diferentes capacidades; por ejemplo, la profundidad del arado. Una distinción más detallada de acuerdo con los requerimientos reales de poder o capacidad en términos de caballos de fuerza no se considera relevante, porque esto dependerá de las condiciones locales, tales como tipo de suelo, ya que no resultará un indicador directo del grado de perturbación del suelo.

Se añade un atributo técnico que describe el tipo de arado usado, las opciones son: arado de vertedera, arado de disco, o arado de cincel. De acuerdo con el orden mencionado, estos arados se presentan desde el menos eficiente en remover el suelo y dejará más estructura intacta en el suelo. Se debe mencionar aquí si se practica la labranza mínima. La labranza mínima se refiere a aquellos sistemas donde el arado y la siembra son típicamente una combinación de una sola operación, donde la labranza del suelo se restringe a hacer agujeros para sembrar, en lugar de labrar el campo entero o donde el grado de perturbación se minimiza con el uso de equipos especializados, tales como la unidad de sembrado directo (*ripper-planter*) utilizada en la agricultura de conservación (de Freitas, 2000). La “eficiencia” en términos de horas por hectárea requerida para la operación se añade como un atributo opcional. La eficiencia se refiere más a lo económico que a lo ambiental, en el sentido de que una mayor o menor eficiencia no causará mayor o menor impacto en el suelo y los organismos que se encuentran en él; pero al contrario, el suelo (y otras condiciones ambientales) afectarán la eficiencia de la operación; aquí se incluye su compatibilidad con los métodos que incorporan el uso de combustibles fósiles en los cálculos de la intensidad del uso de suelo. El uso de combustibles puede fácilmente estimarse si se conoce su eficiencia, tipo de equipo y tipo de tracción. Opcionalmente, el uso de combustibles debería añadirse como atributo en el siguiente nivel más alto de especificación.

La principal preocupación relacionada con el control de las malezas, plagas y enfermedades es el uso de agroquímicos. Por lo tanto, se podría considerar combinar ambos (mecánica y química) dentro de un clasificador que describa el uso de agroquímicos (excluyendo fertilizantes orgánicos); sin embargo, sería más sencillo

y práctico manejarlas por separado. El clasificador para el control de malezas especifica el modo de mecanismos de control, sea por el método de herbicidas, mecánico, biológico o cultural. En el caso de medidas de control culturales (y biológicas), por ejemplo, la rotación de cultivos, el barbecho, etc., estas han sido registradas de las prácticas de uso de suelo en los niveles previos del sistema de clasificación y, por ello, no se incluyen en el valor de dominio.

“No quitar malezas” puede atender a situaciones donde no existe la extracción real de las malezas. Respecto al deshierbe manual se hace una distinción

Tabla 11.6a Clasificadores y atributos relacionados con la limpieza de la parcela, labranza y deshierbe.

Nivel 4 – Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Limpieza [Sin limpiar; manual; mecánica; química]	Manual Modo [desmontar y quemar; desmontar y cubrir con abono verde]	
	Mecánica Grado [limpieza moderada, intermedia e intensa]	
Labranza [Sin labranza; manual (azadón); tracción animal; mecánica]	Manual	Alcance de la labranza [labranza completa, reducida o mínima]
		Eficiencia (horas/ha)
	Tracción animal Tipo (y número) de animales usados [búfalo, buey, vaca, caballo, mula/burro] Mecánico Clase de maquinaria [dos ruedas (ligera), cuatro ruedas (pesada)]	Tipo de arado [vertedera, disco, cincel, labranza mínima/unidad de sembrado directo (ripper-planter)] Eficiencia (horas/ha) Tipo de arado [vertedera, disco, cincel, labranza mínima/unidad de sembrado directo (ripper-planter)] Eficiencia (horas/ha)
Deshierbe [Sin deshierbe, a mano, mecánico, químico]	Deshierbe a mano Tipo de deshierbe [con azadón, con la mano]	Eficiencia (horas/ha)

Tabla 11.6a *Continúa.*

Nivel 4 – Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
	Mecánico Tipo de deshierbe [labranza frecuente, cultivo para el control de malezas]	Eficiencia (horas/ha) Tipo de equipo (ej. azadón de presión, azadón rotatorio) Eficiencia (horas/ha)
	Químico Tipo de equipo [aspersor de mochila, otros mecanismos]	Volumen de aplicación [VB (< 850 g ia/ha); VI (entre 850 y 2500 g ia/ha); VA (> 2500 g ia/ha)] Herbicida, ingrediente activo y tasa de aplicación

entre si esto se lleva a la práctica con el uso del azadón o mediante la extracción totalmente manual. En cuanto al uso de químicos en el control de malezas, la distinción se hace acorde con su aplicación: el uso de aspersor de mochila es el más común. Una diferencia más, se basa en el volumen de la aplicación que resulta no viable, si se considera el gran número de herbicidas que se encuentran disponibles en el mercado, los diferentes tipos de ingredientes activos y las fórmulas que existen (Oregon State University, 2005). Sin embargo, dado que el *Roundup* es, por mucho, el herbicida más usado en los trópicos (www.weeds.iastate.edu/mgmt/2004) por la cantidad de aplicaciones especificada en gramos equivalentes de ácido (ea) por hectárea de glifosato, que es la sustancia activa del *Roundup*. Las especificaciones son asignadas de manera arbitraria, basadas en recomendaciones generales para su aplicación en diferentes cultivos, los cuales se convierten de libras por acre a gramos por hectárea (weeds.ippc.orst.edu/pnw/weeds). Una tasa de aplicación de (ea) menos de 850 g ha⁻¹ se considera un volumen bajo (VB) de aplicación, mientras que una aplicación (ea) de más de 2500 g ha⁻¹, se considera un volumen alto (VA); si se requiere información más detallada acerca del *Roundup*, o cualquier otro tipo de herbicida, se debería especificar el ingrediente activo (ia), junto con la cantidad en gramos del ingrediente activo por hectárea. Si se considera de vital importancia, se recomienda implementar un sistema de clasificación para la aplicación de volumen de herbicidas que sea relevante para el área en cuestión. Las especificaciones de manejo de malezas no cubren todas las medidas de control de malezas, por lo

que la libreta de campo es un buen complemento para la observación relacionada con cualquier medida específica de control de malezas.

Con relación a las medidas de control de plagas y enfermedades, se definen clases similares: control natural o medidas culturales; control biológico o mecanismos de control químico (Tabla 11.6b). Respecto al uso de pesticidas, fungicidas u otros químicos, se hace una distinción basada en si éstos son ampliamente aplicados en todo el campo o si la aplicación se restringe a puntos específicos y también al tipo de equipo utilizado. Las clases de volúmenes para aplicar pesticidas se obtienen de Craig *et al.* (2002) y son usadas en caso de aspersión aérea. Se presume que el modo de aplicación no traerá muchas consecuencias para la tasa de aplicación, y las mismas clases de volumen se consideran relevantes, sin tomar en cuenta su modo de empleo. Los volúmenes especificados se refieren a la forma líquida en la cual el pesticida o el fungicida se obtienen, sin considerar las disoluciones hechas antes de la aplicación. En este punto, en caso de considerarse relevante, se podrían especificar cantidades reales de aplicación.

En cuanto a los fertilizantes orgánicos e inorgánicos, se prevén especificaciones para la tasa de aplicación. Para abonos, estos se basan en asumir un contenido de materia orgánica del 30%. Generalmente, se presume que se requieren entre 5 y 10 toneladas por hectárea para poder mantener los niveles de humus en el suelo; estas cantidades se suministran una vez cada cuatro a seis años (ILACO, 1985). La frecuencia de la aplicación puede variar y en la tabla que se observa a continuación, las cifras se convierten en tasas de aplicación por año. Tasas de aplicación bajas de menos de una tonelada por hectárea por año se consideran insuficientes para mantener los niveles de humus y de materia orgánica en el suelo. Dos toneladas por hectárea por año se consideran suficientes para todo tipo de cultivo.

Con respecto a la aplicación de fertilizantes inorgánicos, los rangos de tasas de aplicación se especifican para los límites superiores e inferiores de las clases, en lugar de usar un valor en particular. Eso se hace para poder acomodar los diferentes grados de fertilizantes. Los fertilizantes de bajo grado tienen menos del 25% de nutrientes para las plantas, mientras que los fertilizantes de alto grado contienen hasta el 50% de elementos nutritivos. Cuando se utilicen fertilizantes de bajo grado, se deberán tomar en cuenta los valores más altos, dentro del rango especificado. Los elementos nutritivos pueden referirse a un solo elemento (por ejemplo N) en los fertilizantes simples o la combinación de elementos en mezclas incompletas o mezclas completas (el porcentaje de peso se relaciona al N para el nitrógeno, P_2O_5 para el fósforo y K_2O para el potasio) El índice toma

75 kg ha⁻¹ de N como punto de referencia para la aplicación de N. Esto sería la aplicación recomendada para un suelo moderadamente fértil que produce alrededor de cuatro toneladas de maíz (grano), para alrededor de tres toneladas de trigo en suelos relativamente fértiles y 25 toneladas de mandioca en suelos moderadamente fértiles. Una aplicación de 75 kg ha⁻¹ de N requerirá 150 kg ha⁻¹ de un fertilizante con N de alto grado y alrededor de 350 kg ha⁻¹ de un fertilizante de bajo grado; por lo tanto, estos valores se toman como el límite superior de la clase de “tasa de aplicación de fertilizante medio”. Las otras clases se derivan de estas cifras, en donde una tasa muy baja de aplicación representa alrededor de 10 a 15% de esta cantidad de referencia. Si las tasas de aplicación son generalmente altas, o si las tasas de aplicación altas son de particular interés, se podría considerar añadir una clase para las tasas muy altas que serían aplicaciones de 300 kg ha⁻¹ o más, de un fertilizante de alto grado y de 700 kg ha⁻¹ o más de un fertilizante de bajo grado. La aplicación del fertilizante, ya sea en o alrededor del hoyo de plantación, será relevante en el caso de tasas bajas o muy bajas de aplicación.

La manera en que se prepara la parcela puede tener un profundo impacto en la biodiversidad del suelo, por lo tanto, se incluye como clasificador separado. Esto sería particularmente relevante donde se practican cultivos migratorios o donde las selvas han sido convertidas recientemente en suelo agrícola, lo que ha ocurrido en algunos márgenes de selvas en donde opera el proyecto CSM-BGBD. La limpieza también es importante en sistemas de barbecho, especialmente, cuando incluyen quemas.

“Sin limpieza” (ver Tabla 11. 6a) se enlista cuando el campo ha sido convertido a partir de bosque o vegetación secundaria desde hace más de 20 años, lo cual coincide más o menos con la duración máxima de barbecho bajo sistemas de cultivos migratorios. La conversión puede incluir operaciones para nivelar el suelo. Otra distinción se hace basada en el tipo de equipo usado. “La limpieza moderada” está indicada cuando se utilizan medios manuales y mecánicos, en donde los árboles se cortan a mano o con sierra de cadena y los troncos se remueven utilizando tractores u otra maquinaria más ligera. La “limpieza intensa” significa que la tierra se limpia completamente con el uso de tractores oruga y otra maquinaria pesada. En todos los sistemas es importante registrar si la quema se lleva a cabo para eliminar la vegetación muerta o si esta vegetación se queda como abono orgánico. Actualmente, se hace una distinción entre sistemas de “desmontar y quema” y “desmontar y cubrir con abonos verdes”. Sin embargo, cualquier incidencia de fue-

go como parte de las prácticas de manejo deberá registrarse en esta sección como fenómeno importante.

Tabla 11.6b Clasificadores y atributos para el manejo de plagas y enfermedades, fertilizantes y cosecha.

Nivel 4 – Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Manejo de plagas y enfermedades [medidas preventivas y control natural; control químico y biológico]	Control químico	
	Aspersión [aspersión focalizada, aspersión en toda la parcela]	Volumen de aplicación [UVB (<10L/ha); VB (entre 10-100L/ha); VI (entre 100 y 200L/ha), (VA >200L/ha)]
	Equipo usado [aspersor de mochila, aspersor de motor, vehículos, aviones]	Tipo de químico y tasa de aplicación
Fertilizantes [sin fertilizante; abonos; fertilizantes químicos; combinación de fertilizantes químicos y orgánicos]	Fertilizantes orgánicos Tipo de fertilizantes [residuos de cultivos, abono verde, composta; estiércol de corral]	Tasa de aplicación [baja (<1t/ha/año); media (entre 1–2 t/ha/año); alta (>2 t/ha/año)]
	Aplicación [hoyos, franjas, o de manera homogénea en la parcela]	
	Inorgánico Clases de fertilizantes [simple, mezclas incompletas, mezclas completas]	Tasa de aplicación [muy baja (<20 – 60 kg/ha), baja (entre 25–60 y 75–175 kg/ha), media (entre 75–175 y 150–350 kg/ha), alta (>150–350 kg/ha)]
	Aplicación [hoyos, franjas, o de manera homogénea en la parcela]	
Cosecha [manual, mecánica]		Eficiencia (Horas/ha)

Otras observaciones sobre el manejo de suelo y cultivos

Aparte de registrar las características del manejo de suelo y de cultivos como se describió en las tablas anteriores, se recomienda que las observaciones de las prácticas de conservación de suelo y agua, al igual que las del estatus del cultivo, sean incluidas. Las medidas de conservación de suelo y agua afectarán las poblaciones de organismos del suelo indirectamente por el almacenamiento de agua mejorada, lo que aumenta la capacidad de retención y reduce la pérdida de suelo. La información de las medidas de conservación no se captura directamente en el registro de los atributos enlistados arriba. El registro debe contener la descripción de las medidas de conservación del suelo y el agua, incluyendo las relacionadas con técnicas de recolección de agua.

La *World Overview of Conservation Approaches and Technologies* (WOCAT), provee una visión general en su página *web* de muchas técnicas existentes (www.wocat.net). Probablemente, la mejor manera de categorizarlas es determinar si incluyen medidas agronómicas (como cultivos mixtos, cultivos en curvas de nivel, acolchonado, etc.), el uso de elementos de vegetación (referido a tiras de pastizales, barreras de setos, corta vientos y otros) o medidas estructurales que incluyen terrazas, bancos, muros de contención, construcciones y empalizadas, entre otras. Las técnicas de recolección de agua como cavar zanjas, hondonadas y otras, se incluyen como medidas estructurales; si se conoce la técnica con un nombre en particular (por ejemplo "Zai", que se practica en el Níger), esta información deberá adjuntarse.

Las observaciones del estatus de los cultivos podrían ser útiles para corroborar los resultados anteriores (o resultados de clasificación), especialmente, cuando se relacionan con su manejo. La información sobre el rendimiento de la cosecha es igual de útil, pero no como base de clasificación. El rendimiento del cultivo como indicador integra muchos factores, por lo que es difícil obtener cifras confiables y del todo correctas. Las evaluaciones del rendimiento basadas en campo deberán incluir lo siguiente: población de plantas por metro cuadrado, número de macollos por planta de cereal, altura y diámetro relativos del cultivo en crecimiento (ver Stocking y Murnaghan, 2001). Estos datos proporcionan información adicional sobre el cultivo principal tal y como se especifica en el primer nivel del sistema de clasificación. De manera alternativa, las características del crecimiento del cultivo pueden utilizarse como una medida representativa del rendimiento. De manera general, el crecimiento puede clasificarse como: crecimiento retardado, en donde se observa que la altura del cultivo es menor, cuando se compara con un cultivo de

crecimiento vigoroso; plantas de menor vigor, con un diámetro del cultivo menor y una decoloración generalizada en sus hojas; y cultivo de crecimiento vigoroso. Existen guías disponibles para registrar deficiencias específicas de nutrientes en cultivos (ver Stocking y Murnaghan, 2001) por signos de déficit de nutrientes en maíz, frijol y col.

Las observaciones del estatus del cultivo deberán acompañarse de observaciones acerca de la incidencia de plagas y enfermedades e incluir el porcentaje del cultivo afectado, y la severidad de la infección en términos del grado en el cual la planta es afectada. Si se conoce la plaga o enfermedad específica, deberá enlistarse su nombre. Queda fuera del marco de este capítulo proporcionar información más detallada sobre plagas, enfermedades y sus clasificaciones.

Patrones de distribución en el campo y árboles en la finca

Las observaciones relacionadas con el tipo de campo y con los elementos de vegetación leñosa dentro de la parcela bajo observación y sus alrededores están incluidas. Esto permite la inclusión de elementos de vegetación leñosa en la descripción que no están capturados en el sistema de descripción de uso de suelo. Este es el caso cuando la cobertura de árboles es escasa (menos de 10 a 20%), lo cual puede ocurrir cuando los árboles están dispersos dentro de la parcela, cercas vivas y otros elementos de vegetación importantes; todos a nivel parcela o paisaje. Además, permite una evaluación del uso del suelo en un punto de muestreo particular, dentro del contexto del uso de suelo en las áreas de los alrededores (esto ayuda a establecer si el uso de suelo en la parcela en observación es representativo o no), lo que resulta importante para un mapeo del uso de suelo, y finalmente, permite la validación y la verificación de las observaciones en el lugar del muestreo. El uso de suelo en el área circundante del punto de muestreo tendrá una notable influencia sobre la biodiversidad del suelo de la parcela en observación, por ejemplo, en el caso de cultivos migratorios o sistemas de barbecho, se esperaría encontrar barbecho como parte del patrón de uso de suelo; el factor Ruthenberg se establece, en principio, dentro de una proporción espacial entre barbecho y el suelo cultivado en el uso de suelo actual. La fragmentación del uso de suelo que puede ser evaluada a partir de estas observaciones resulta ser, por sí misma, un importante aspecto de la intensidad del uso del suelo.

Respecto a la distribución de los campos (evaluación del patrón de distribución), la primera distinción se hace en función de si éstos son continuos, están dis-

tribuidos en forma de racimos o dispersos (ver Tabla 11.7). La segunda distinción se refiere al tamaño, forma y patrón de los campos y finalmente, queda una opción para especificar los porcentajes del área usando varias categorías: tierras cultivadas y áreas manejadas, áreas terrestres seminaturales, áreas acuáticas cultivadas o de inundación regular, vegetación acuática (semi) natural, superficies artificiales, áreas vacías o cuerpos de agua artificiales y cuerpos de agua naturales (hielo y nieve), utilizando las clases mayores de cobertura de suelo del LCCS. Los distintos componentes de uso del suelo pueden describirse con mayor detalle, lo que parece relevante especialmente en el caso de áreas cultivadas terrestres, en donde se especifican los cultivos principales, son las características del suministro de agua y la permanencia del cultivo. El patrón del campo se relaciona a la forma del lugar y al arreglo espacial del mismo.

Tabla 11.7 Características de la parcela y distribución del uso de suelo.

Clasificador espacial	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Distribución espacial de la parcela [continua; agrupada; dispersa]	Continuo Distribución del tamaño de la parcela [uniforme, irregular]	Uniforme clases de tamaño (mayoría del campo) [pequeña, mediana, grande]
	Patrón de la parcela [regular, irregular]	Cultivo principal (lista de los cultivos de cuatro parcelas vecinas)
	No continuo	
	Parte de las tierras cultivadas [% de cultivo y área de manejo] Parte de la cobertura vegetal [% de área (semi) natural]	Cultivo principal (lista de cultivos de cuatro parcelas vecinas) Cobertura del suelo (cobertura dominante de áreas no cultivadas)
	Parte del área acuática cultivada [% de área acuática cultivada]	Tipo de cultivo o actividad
	Parte acuática no cultivada [% de área acuática no cultivada]	Tipo de área acuática
	Área urbanizada [% de superficie artificial]	Tipo de área urbanizada (ej. Residencial, industrial, etc.)

Tabla 11.7 *Continúa.*

Clasificador espacial	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
	Suelo desnudo [% de áreas desnudas]	
	Cuerpos de agua [% de cuerpos de agua]	Tipo de cuerpos de agua [artificial; natural (especificar tipo, como estanques, pantanos, presas, si es posible)]

El último elemento que debe ser registrado es la presencia de elementos permanentes de vegetación leñosa en el paisaje. Se hace referencia a éstos como árboles en una finca (TROF). Se entiende que los tramos de bosque y otra vegetación leñosa fueron ya cubiertos por el método de clasificación para uso de suelo. En el caso de porcentajes bajos de cobertura de árboles y árboles dispersos dentro del campo o alineados en forma de cerca viva, este podría no ser el caso, aunque estos elementos pueden ser característicos del uso y cobertura del suelo y tener mayor influencia sobre la presencia de la biota específica del suelo. El primer atributo describe la distribución espacial de los árboles. Las “zonas verdes” se refieren a árboles espaciados en filas dispuestas como empalizadas. La Tabla 11.8 especifica los atributos utilizados para describir los TROF. Los atributos técnicos permiten una descripción del tipo de árbol (ya sea por especie u otro nivel taxonómico) y el propósito de tener árboles (por ejemplo, para cosechar frutas, nueces; para madera, para leña o material de construcción). Más información trata de la cobertura o densidad del componente árbol, especificado en términos del número de árboles por hectárea o longitud de los elementos lineales de la vegetación leñosa. La información sobre los árboles pertenecientes a la familia leguminosa es útil en relación con la ocurrencia de las bacterias formadoras de nódulos. Como se ha mencionado, es importante registrar la localización del punto de muestreo respecto al lindero del campo.

DESCRIPCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE USO DE SUELO

Definición y descripción de clases de uso de suelo

No es el propósito de este capítulo describir cómo las clases de uso de suelo se definen. Es importante derivar las clases de manera sistemática, a partir de los cla-

Tabla 11.8 Características de los árboles en la finca (TROF).

Nivel 5 Clasificador	Atributo técnico 1	Atributo técnico 2
Tipo de TROF [sin TROF; cercas vivas; árboles dispersos dentro de la parcela; barreras contra el viento u otros elementos leñosos; zonas verdes]	Cercas vivas: especies de árboles	Cobertura (% de linderos que constituyen cercas vivas)
	Árboles dispersos dentro de la parcela Propósito [principalmente frutas y nueces; principalmente madera; principalmente árboles de sombra; otros]	Densidad (número de árboles por ha)
	Barreras contra el viento u otros arreglos lineales: especies de árboles Empalizadas: tipo o especie dominante	Longitud total por ha (m/ha)

sificadores y atributos presentados aquí, utilizando reglas de decisión, de manera que un conjunto de clases definido para un área en particular puede ser fácilmente mapeado en el conjunto de clases utilizados para otra área y viceversa. Los principios de la definición de usos de clase de suelo, el diseño de la clasificación jerárquica y el atributo de los valores de clase, relacionados con observaciones de campo, son explicados a continuación.

Las clases se definen por la combinación particular de clasificadores y atributos (determinados por el valor de los mismos). No todos los atributos o clasificadores tendrán que tomarse en cuenta, lo que determina el nivel de detalle con que se definen las clases. Si únicamente se consideran los primeros tres niveles en la clasificación jerárquica, una clase de uso de suelo podría ser definida en función de los siguientes valores de atributos: "cultivo de árboles", "parcela de tamaño grande", "cultivo único", "cultivo de temporada" y "cultivo permanente". Esto se traduce en "plantación de árboles". Si se contemplan atributos adicionales del cultivo principal (por ejemplo, tipo de cultivo), es posible distinguir entre una plantación de teca y otra de hule. Por otra parte, cuando se toman en cuenta atributos técnicos adicionales, no necesariamente tienen que implicar una definición de un conjunto adicional de clases en el siguiente nivel de la clasificación jerárquica; por ejemplo, distintos grados de cobertura de árboles pueden observarse dentro de la clase "plantación de árboles" (o aun dentro de las plantaciones de teca), pero esto pue-

de no ser relevante para definir clases separadas de plantaciones de árboles. Más bien, se retiene la información sobre el porcentaje de cobertura como un valor de atributo en particular para cada observación individual (instancia u ocurrencia) del objeto clase (es decir, plantación de árboles).

Una clasificación jerárquica se establece de manera similar, decidiendo la presencia de un clasificador sobre otro. Esto se refiere a los niveles de la clasificación jerárquica, como han sido presentados arriba, y no a los niveles de generalización (el segundo eje en el sistema de clasificación). Debido a que el sistema que se presenta trata de áreas cultivadas y manejadas, la jerarquía considera el cultivo principal como la puerta de entrada; sin embargo, en áreas donde los cultivos migratorios o permanentes se practican uno al lado del otro, el factor “tiempo de cultivo” puede tener prioridad sobre el cultivo principal como la característica dominante. No obstante, esta característica es general en áreas grandes y no en parcelas, y por ello podría usarse para realizar ejercicios de mapeo a pequeña escala, en donde el factor “tiempo de cultivo” sería el parámetro en la jerarquía agregada y no, en la jerarquía de clasificación para observaciones en parcela. Para una explicación de clasificación y jerarquías agregadas, ver Huising (1993).

La Tabla 11.9 proporciona una lista generalizada de los clasificadores y atributos de clases de acuerdo con el nivel la clasificación jerárquica. Debido a la estructura anidada, no todos los atributos pueden ser fácilmente organizados en una tabla. Para información precisa habrá que referirse a las Tablas 11.1 a la 11.8. La Tabla 11.9 contiene una vista global de la estructura de la clasificación principal. Las clases se asignan de acuerdo con las reglas de decisión y al mismo tiempo las clases se definen. Las reglas de decisión generalmente toman la forma de un conjunto de condiciones SI – ENTONCES que aplica los atributos, combinados a través de operadores Booleanos (es decir, Y, O, XO y NO). Por ejemplo:

SI (<forma de vida> igual a ‘árbol’ y <tamaño de parcela> igual a ‘grande’ y <combinación de cultivos> igual a ‘único’ y <factor tiempo de cultivo> igual a ‘permanente’) ENTONCES <clase> = ‘plantación de árboles’.

Para ilustrar la definición y descripción de la clase, hay que tomar en cuenta los valores especificados para los diferentes clasificadores y atributos técnicos, tal y como se observa en la Tabla 11.10. Los clasificadores especifican un “cultivo de árboles”, un “campo grande”, “sin irrigación”, y “un cultivo permanente”, lo que

significa una plantación grande de árboles. Tomando en cuenta la información del cultivo principal (clasificadores del nivel 1) se describirá la parcela como grande (con 10,000 m² por tamaño de la parcela); una plantación de más de 10 años de teca (que forma un dosel cerrado), con 100 árboles por hectárea y que recibe 1,200 mm de lluvia por año. Si se utiliza la información sobre la especie de árbol, se pueden distinguir plantaciones de árboles destinadas a la producción de madera para tablas o para otros fines y si se utiliza la información sobre el propósito, se pueden distinguir plantaciones de frutales, de cacao y otras.

Algunos de los clasificadores de suelo y atributos de suelo y cultivos, frecuentemente no son relevantes para cultivos de plantación, porque la preparación del campo, el manejo de plagas, enfermedades y la fertilización del suelo no tienen lugar. Se pueden tomar en cuenta medidas para el control de malezas mediante corte o también el uso de químicos. El manejo de estas plantaciones, por lo tanto, se clasificará como "extensivo". Las diferencias entre la intensidad de uso de suelo, con relación a la variedad de plantaciones, podría basarse en la clase de atributo nivel 1 "densidad de árboles" o en el atributo nivel 2 "combinación de cultivo de árboles", lo cual únicamente tendrá sentido si existe una gran variación de dichas características dentro del área y si éstas reflejan diferentes regímenes de manejo. Esto, por ejemplo, permitirá una distinción entre hule de "jungla", a un sistema agroforestal en donde los árboles de hule (*Hervea brasiliensis*) crecen dentro de la selva (Joshi *et al.*, 2002) o en lugares donde se cultivan únicamente árboles de hule.

En cuanto a los clasificadores del nivel 5, es importante informar sobre el uso del suelo circundante, por ejemplo, si la plantación de árboles bajo estudio es un pequeño bosque aislado dentro de un ambiente dominado por cultivos anuales, o si forma parte de un paisaje dominado por plantaciones de cultivos de árboles.

La Tabla 11.11 muestra los datos para una parcela imaginaria de maíz. El primer nivel especifica que se trata de una pequeña parcela cuyo cultivo principal es el maíz; el segundo nivel indica que entre el maíz se encuentran otros cultivos y, el tercer nivel, que la parcela es cultivada de manera permanente con un pequeño periodo de barbecho cada dos años. La principal categoría de uso de suelo a la que esta parcela en particular pertenecerá puede definirse como "cultivos permanentes a pequeña escala con maíz como cultivo principal". Posteriormente, se podría definir una subclase añadiendo la descripción "intercalada con un cultivo de leguminosas" para distinguirla del maíz como único cultivo. De manera alternativa, si la información es correcta y se considera importante en el contexto de la clasifica-

Tabla 1.1.9 Niveles del 1 al 5 de clasificadores y atributos para la clasificación del uso de suelo.

Clasificador	Nivel 1 características del cultivo y el campo			Nivel 2 cultivo combinado			Nivel 3 prácticas culturales			
	Forma de vida del cultivo principal	Clase de tamaño del campo	Cobertura del cultivo	Tamaño del campo	Clase de cobertura del cultivo	Número de cultivos	Arreglo espacial	Suministro de agua	Factor tiempo de cultivo	Tipo de barbecho
Atributos Nivel de especie 1	Tipo de cultivo (categoría)	Forma del campo			Densidad o espacio entre plantas	Segundo tipo de cultivo		Tipo de irrigación	Duración del periodo de barbecho	Tipo de barbecho
Atributos Nivel de especie 2	Cultivo específico (categoría o especies)							Cantidad de agua suministrada	Índice Ruthenberg	Tipo específico de barbecho
Atributos Nivel de especie 3	Cultivo variedad (especie o variedad.)					Tercer tipo de cultivo				
Clasificador	Nivel 4 manejo			Prácticas de fertilización			Modo de cosecha			
	Medios de limpieza	Modo de preparación del campo	Modo de deshierbe	Manejo de plagas y enfermedades	Alcance de la operación	Frecuencia	Tipo de fertilizante	Volumen aplicado		
Atributos Nivel de especie 1	Grado de limpieza	Modo de limpieza	Tipo de operación	Frecuencia	Frecuencia					

Tabla 1.1.9 Continúa.

		Nivel 1 características del cultivo y el campo		Nivel 2 cultivo combinado		Nivel 3 prácticas culturales	
Atributos Nivel de especie 2	Tipo de arado	Tipo de equipo	Tipo de equipo	Ubicación, Modo de equipamiento	Aplicación		
	Alcance de la operación						
Atributos Nivel de especie 3	Eficiencia	Clasificación de la aplicación	Clasificación de la aplicación	Clasificación de la aplicación	Eficiencia		
Atributos Nivel de especie 4		Tipo de herbicida	Tipo de químicos	Tipo de fertilizante			
		Volumen aplicado	Volumen aplicado	Volumen aplicado			
Nivel 5 Configuración espacial del campo y árboles en la finca							
Clasificador	Configuración espacial de los árboles en la finca	Patrones de distribución del campo					
Atributos nivel 1	Propósito de los árboles en la finca	Cobertura de árboles (copa)	Partes del área terrestre cultivadas y manejadas		Partes terrestres no cultivadas		
Atributos nivel 2	Tipo de especies de árboles dominantes	Densidad de árboles o longitud de barreras	Patrones de distribución del tamaño del campo	Arreglo espacial del campo	Forma de vida del cultivo principal	Otros tipos de uso o cobertura	

Tabla 11.9 Continúa.

Nivel 5 Configuración espacial del campo y árboles en la finca				
Atributos nivel 3	Especies de árboles	Tamaño o clases de tamaño del campo	Tipo de cultivo principal	% cobertura

Tabla 1.1.10 Ejemplo de clasificadores y de posibles valores de atributos de una plantación de teca.

Clasificador	Nivel 1 Características del cultivo y el campo			Nivel 2 Combinación de cultivos			Nivel 3 Prácticas culturales		
	Árboles	Grande		Único			De temporada	Permanente	
Atributos técnicos Nivel 1	Perenes, de hoja ancha leñoso	Regular	10,000 m ²	Vegetación natural*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Atributo técnico nivel 2	Teca	>10 años		Cerrado					
Atributo técnico nivel 3	<i>Tectona grandis</i>						100 árboles/ha	1,200 mm**	n/a

* En este caso, si es relevante, se puede describir las plantas debajo de los árboles y estas plantas pertenecerán a la categoría de vegetación (semi) natural, para lo cual se utilizan otros parámetros, aunque no se discuten en este capítulo.

** En el caso de sistemas de temporada de ser posible debe especificarse la cantidad de lluvia, aunque esto por lo general se describe en las características del sitio.

Tabla 1.1.1.1 Ejemplo de clasificadores y valores de atributos para parcelas de maíz.

Clasificador	Nivel 1 Características del cultivo y el campo			Nivel 2 Combinación de cultivos			Nivel 3 Prácticas culturales			
	Gramíneas	Pequeño		Múltiple			De temporada	Permanente		
Atributos nivel de especie 1	Cereales	Cuadrada	2,000 m ²	Mediano a grande	1 cultivo adicional	Simultaneo	2 filas alternadas	NA	Intermitente	Mejorado
Atributos nivel de especie 2	Maíz			75 x 25 cm	Frijoles			NA	0.16	Mucuna (abono verde)
Atributos nivel de especie 3										
Nivel de manejo 4										
n/a	Tracción animal		Mecánica y química		Ninguno		Fertilizante químico		Manual	
n/a	2 bueyes		Labranza frecuente (2x) y fumigación una vez (1x)		n/a	n/a	Directamente hoyos			
n/a	Arado de vertedera		Aspersor de mochila		n/a		VMB (muy bajo)			
	n/a		VB (Roundup)		n/a		50 kg CAN/ha			
Nivel 5 Configuración espacial del campo y árboles en la finca										
No TROF			Continuo							
n/a		n/a	90%						10%	
n/a		n/a	Uniforme		Regular		Hierbas y gramíneas		Caminos - infraestructura	
n/a			Pequeño				Chicharos, habas, maíz		n/a	

ción, el criterio para mejorar el barbecho podría considerarse en la definición de las subclases. La información específica se refiere a la densidad de la planta, al arreglo específico de la combinación del cultivo y a qué especie es utilizada para mejorar el barbecho, sin que esto quede reflejado en la definición de las clases.

Manejo y nivel de insumos: la información en el manejo del cultivo y el suelo habla de que el nivel de perturbación del suelo se considera intermedio (habiendo sido arado dos veces con el uso de tracción animal) y que el insumo de químicos ha sido bajo, con un bajo volumen de herbicidas, sin el uso de fungicidas o pesticidas y únicamente con muy baja cantidad de fertilizantes. Esto podría traducirse, dependiendo de las reglas de clasificación, en “un manejo caracterizado por el uso de tracción animal y bajo insumos agroquímicos”.

Los clasificadores de nivel 5 y los atributos describen que el suelo es cultivado de manera continua, principalmente, con cultivos anuales; que las parcelas son generalmente pequeñas, con escasa o sin presencia de árboles, que indica patrones de uso de suelo fragmentados y un uso intensivo del suelo.

Esta sección pretende demostrar cómo un conjunto de clases podrá definirse y organizarse en una estructura jerárquica y que el sistema es bastante flexible en cuanto a la selección de clasificadores y atributos considerados para su clasificación. Un esquema de clasificación estándar no funcionará porque la definición de un conjunto de clases depende del contexto y del propósito específico de la clasificación.

Ordenamiento de las clases de uso de suelo respecto a la intensidad de su uso

En sistemas agrícolas, el manejo tiene por objetivo modificar o establecer condiciones que propicien la producción de un cultivo. El grado de interferencia con (perturbación o alteración) el ecosistema natural sería una buena medida de la intensidad del uso de suelo. La norma general es que los sistemas culturales y manejados son más intensivos que los naturales (cuanto más insumos de manejo se requieran para mantener los sistemas, más intenso será su uso).

Parece que existe un consenso sobre los factores que determinan la intensidad del uso de suelo, pero una definición de un índice o medida de la intensidad de uso de suelo no es fácil. Giller *et al.*, (1997) definieron un índice de intensidad de uso de suelo que considera la frecuencia de la ocupación de suelo (según lo expresado en el índice Ruthenberg), uso de nutrientes, manejo de plagas, insumos de ener-

gía y manejo de agua, como factores relevantes. Han existido varios intentos por definir una medida de intensidad de uso de suelo, pero éstos no han sido del todo exitosos, puesto que es difícil asignar un peso adecuado a las variables explicativas, reflejando el grado en el que estos factores tienen un efecto en los ecosistemas (el grado en el que se altera o perturba el ecosistema natural) y debido a que algunas veces los datos requeridos para una evaluación cuantitativa de la intensidad del uso de suelo no son accesibles. Además, los esfuerzos para crear un índice universal o una medida de la intensidad de uso de suelo serán inútiles, puesto que cada índice es una expresión particular de la intensidad del uso de suelo, con la relevancia de que un índice en particular depende del contexto o propósito para el cual se está desarrollando.

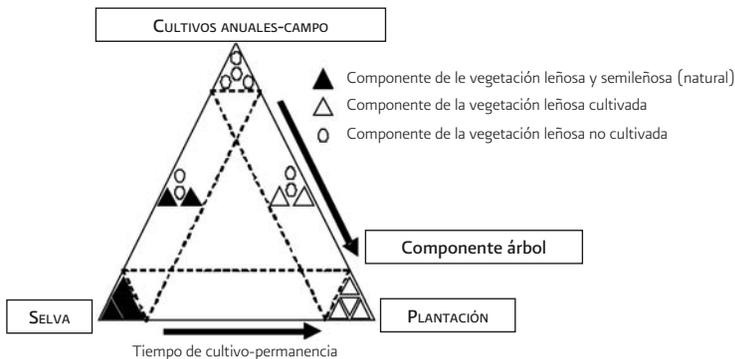
Para los propósitos de investigar tendencias en la pérdida de la diversidad del suelo en relación con un incremento en la intensidad de su uso, se requieren categorías de clases de uso de suelo en términos de la intensidad de uso de suelo (o alternativamente una definición de clases de uso de suelo que reflejen diferentes niveles de la intensidad de uso de suelo). Esto se hace considerando aquellos atributos (y clasificadores) que expresen un aspecto en particular de la intensidad de uso de suelo. Existen dos principales ejes a lo largo de los cuales se mide la intensidad del uso: el primero, se refiere a la permanencia (o frecuencia) de operaciones y el segundo, a la intensidad (o amplitud) de las operaciones. En ambos casos, el componente de la cobertura de la vegetación (semi) permanente es un indicador útil. Es decir, en el caso de cultivos migratorios, la proporción del tiempo durante el cual la vegetación del suelo se restablece de manera semipermanente, se traduce directamente en la frecuencia del cultivo. La presencia de vegetación permanente en el sistema de cultivo limitará las posibilidades para cultivar el suelo o la proporción del suelo que puede ser cultivado. También, aunque no directamente relacionado con la influencia de la operación del manejo, la presencia de vegetación permanente disminuirá la influencia de la variación climática en el ecosistema del suelo, indicando que el sistema con una proporción mayor de vegetación permanente (ya sea como elementos de vegetación natural o cultivada) representa una intensidad menor de uso o un grado menor de perturbación.

Lo anterior permite un arreglo de los componentes de la vegetación (objetos) a lo largo de dos gradientes, de la misma manera como lo ilustran Kuechler y Zoonveld (1988). El primer gradiente representa la presencia (proporción en el espacio o tiempo) de vegetación seminatural, que en el entorno de márgenes de selva se traduce en elementos de vegetación leñosa. El segundo gradiente

representa la cobertura de vegetación leñosa, dentro del sistema de cultivo. Los objetos se refieren a árboles que existen en la naturaleza (en el caso de vegetación natural), a árboles plantados o cultivados (árboles cultivados) o elementos de vegetación no leñosos (por ejemplo, cultivos anuales y pastizales) en el caso de elementos de vegetación cultivados. El continuo puede representarse gráficamente con un triángulo en donde los tres ángulos representan los valores extremos de la cobertura del suelo que solo pueden estar constituidos por árboles naturales (es decir, selva), sólo de árboles plantados (plantación) o sólo de cultivos anuales o pastizales. La localización a lo largo de los dos ejes, se determina basándose en los clasificadores y atributos del sistema de clasificación. En primer lugar, la permanencia se expresa con el factor “tiempo de cultivo” y el sistema de clasificación permite un arreglo de clases de uso de suelo, de acuerdo con el incremento en la intensidad: “sin cultivar”- “cultivos migratorios”- “sistemas de barbecho”- “cultivos permanentes” (véase Tabla 11.5). Se puede hacer una subdivisión adicional basándose en la duración del periodo de barbecho, como se ha especificado en el atributo técnico 1, en el siguiente nivel de especificación. Además de servir como una partición en el tiempo, este eje también expresa una partición en el espacio entre los elementos de vegetación natural y cultivada, lo que resulta relevante en el caso de sistemas particulares de uso de suelo, como en el sistema de “hule de la selva” mencionado arriba.

En segundo lugar, dentro de cada una de las clases definidas, pero sobre todo, para el sistema de cultivo permanente, los objetos de uso de suelo son ordenados a lo largo del segundo gradiente de intensidad de uso de suelo, de acuerdo con el componente

Figura 11.1 Disposición del uso del suelo y las clases de cobertura basadas en la presencia y ausencia de vegetación natural, y presencia o ausencia del componente arbóreo.



árbol o arbusto en el sistema de cultivo (referido a las proporciones en el espacio o en el tiempo). Las clases se ordenan de acuerdo con este gradiente utilizando las características del cultivo principal (Tabla 11.1) junto con las características de la cobertura del cultivo (es decir, porcentaje de la cobertura del cultivo, Tabla 11.2) y combinaciones de cultivo (Tabla 11.3). Si la cobertura de los árboles es escasa, tiene que considerarse la información relacionada con los árboles en la finca (Tabla 11.5).

Si únicamente se toma en cuenta la forma de vida del cultivo principal, los cultivos de árboles se consideran menos intensivos cuando se comparan con cultivos de arbustos, de gramíneas y con formas de vida herbáceas. En el caso de cultivos de árboles (sistema basado en árboles) se puede considerar el número de estratos de la vegetación y el porcentaje de cobertura del suelo para una categoría posterior. Por ejemplo, las plantaciones de árboles se consideran menos intensivas que cuando se trata de arbustos pequeños como el del café o té. Una diferenciación adicional para cultivos que no son árboles se basa en la permanencia o duración del cultivo, como se ve reflejado en la información sobre la categoría del cultivo (ver atributo técnico 1, Tabla 11.1). Respecto al tipo de cultivo de gramíneas, la clase "bambú" aparece antes que las clases de "pastos", "cereales" y "arroz" (ver Tabla 11.1). Respecto a los cultivos sin gramíneas, el orden de intensidad de uso sería el siguiente: "cultivo herbáceo", "plátano y otras plantas herbáceas similares", "lúpulo y otras enredaderas perenes herbáceas" y "cultivo de cobertura".

En el tercer paso, se deberá considerar la intensidad de las operaciones. Una vez más, dentro de las clases resultado de los dos pasos explicados arriba, el rango se lleva a cabo basado en las características de manejo (el cuarto nivel en el sistema de clasificación). Existen dos aspectos que deben ser considerados en relación al manejo: uno se relaciona con el grado de perturbación física debida a las operaciones de manejo y el otro se relaciona con el grado de interferencia química con el sistema (uso de agroquímicos). Los clasificadores y atributos del nivel 4 (especialmente relacionados con las operaciones de cultivo, deshierbe y de manejo de plagas y enfermedades) son utilizados para definir las clases de intensidad. A un nivel más general, las cuatro clases de intensidad se definen de acuerdo con el grado de mecanización (es decir, operación de cultivo) y con el grado de uso de agroquímicos (para el control de malezas y manejo de plagas y enfermedades) tal y como se indica en la Figura 11.2. Una asignación de la intensidad de clases se basa en el valor del clasificador en las operaciones de cultivo (es decir, sin cultivo, manual, tracción animal o medios mecánicos). También se podrían considerar operaciones de deshierbe con "deshierbe mecánico", como un nivel más de intensidad.

Figura 11.2. Los cuatro cuadrantes de intensidad definidos por el nivel de mecanización y uso de agroquímicos.



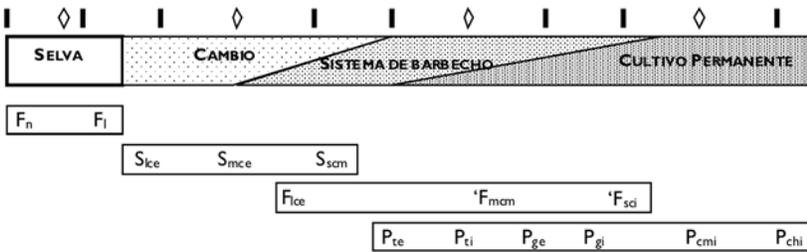
Otra diferencia podría establecerse en función del tipo de animales o maquinaria usada (de acuerdo con los caballos de fuerza) y el tipo de arado empleado. El arado de vertedera tiene un efecto más profundo en el suelo (remoción completa), seguido por el arado de disco, el arado de cincel y, por último, el arado escarificado, que representa el nivel más bajo de perturbación.

En cuanto al orden de categoría respecto del uso de agroquímicos, los clasificadores para el control de malezas y manejo de plagas y enfermedades, son considerados de manera conjunta. A nivel más general, únicamente se considera el “uso” o el “no uso” de agroquímicos, pero una diferencia más, podría basarse en el volumen de aplicación (aplicación selectiva o localizada, tipo de equipo o maquinaria usada en el caso de plagas y enfermedades y el volumen de aplicación; ver Tabla 11.6b).

El procedimiento jerárquico descrito arriba producirá ramificaciones claramente separadas en la clasificación del árbol, y no reconoce que puede haber una superposición considerable en términos de intensidad de uso de suelo entre las clases. Esto se puede observar en la figura 11.3. La superposición será considerable entre las clases de sistemas de barbecho y sistemas de cultivos permanentes, en el primer paso de la clasificación, considerando una plantación de árboles (cultivo permanente bajo manejo extensivo) representará un sistema menos intensivo que un cultivo manejado intensivamente bajo un sistema de barbecho corto.

Para poder llegar a una clasificación final de clases de uso de suelo en términos de intensidad de uso, estas clases tienen que relacionarse entre sí. Al final, una evaluación por pares de clases de uso de suelo individuales en la región de superposición dará la clasificación final en términos de la intensidad de uso de suelo. Como se ilustra en la figura 11.3, la clase de uso de suelo más intensiva pertenece a “cultivos migra-

Figura 11.3 Clasificación del uso del suelo en términos de la intensidad de uso.



Donde:

F_n : selva natural

F_l : selva explorada

S_{ice} : cultivo extensivo, bajo cultivo migratorio (periodo de barbecho > 8-10 años)

S_{mce} : cultivo extensivo, bajo cultivo migratorio (1-2 años < barbecho < 8-10 años)

S_{scm} : cultivo extensivo, cultivo migratorio (barbecho < 1-2 años)

F_{lce} : cultivo extensivo, sistema de barbecho (barbecho > 8-9 meses)

F_{mcm} : cultivo de intensidad media, sistema de barbecho (4-5 meses < barbecho < 8-9 meses)

F_{sci} : cultivo intensivo, sistema de barbecho (barbecho 4-5 meses)

P_{te} : cultivo de árboles extensivo, cultivo permanente

P_{ti} : cultivo de árboles intensivo, cultivo permanente

P_{ge} : pastizales extensivos, cultivo permanente

P_{gi} : pastizales intensivos, cultivo permanente

P_{cmi} : cultivo de intensidad media, cultivo permanente

P_{chi} : cultivo intensivo, cultivo permanente

torios" y es seguida por el de menos intensidad de uso "cultivo permanente", considerando que la cobertura de árboles en plantaciones puede ser entre el 60% al 70% de la intensidad de uso, que corresponde al 66% del tiempo que la tierra no es cultivada, lo que se toma como el límite superior para la clase "cultivos migratorios".

Para establecer una comparación de clases de uso de suelo individual, en las regiones superpuestas entre la categoría mayor de uso de suelo, se aplican los mismos criterios que en el segundo y tercer pasos de la clasificación, donde se determina el orden a lo largo del gradiente de intensidad de uso de suelo descrito anteriormente. Esto quiere decir, en primera instancia, que se considera la forma de vida de la vegetación dominante o cultivo, sin distinguir, en esta fase, si proviene de orígenes culturales o (semi) naturales (por ejemplo, si el suelo está en barbecho el 60% del tiempo y la vegetación de ese suelo es pasto, este pasto se considera el tipo de vege-

tación dominante). En el segundo ejemplo se considera la intensidad de manejo (en relación con el cultivo más demandante del sistema, es decir, “sistemas de barbecho” refiriéndose al componente de cultivo, más que al barbecho en sí) para permitir a la clase bajo consideración subir una o dos posiciones en el orden de clasificación.

De esta manera, los pastizales permanentes, aun en el caso de que sean manejados intensivamente (P_{gi}) tendrán una clasificación más baja en términos de intensidad de uso de suelo, si se compara con un cultivo anual con un sistema de barbecho corto (F_{sc}). Igualmente, un cultivo con un manejo intensivo bajo un sistema de barbecho corto (F_{sci}) puede subir una posición, si se compara con un área de cultivo permanente bajo manejo intermedio o bajo (P_{cmi}). Respecto a la selva, se hace una distinción entre selva natural, selva manejada y selva explotada, de acuerdo con los sistemas de uso de suelo en el trópico húmedo a diferencia del proyecto ASB (Bignell *et al.*, 2005), con la introducción de una noción de que la extracción de productos de la selva sirve como un indicador para la intensidad de uso.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Ken Giller por sus comentarios y al Dr. Peter Okoth por las discusiones en la preparación de este capítulo.

REFERENCIAS

- Bignell, D. E., Tondoh, J., Dibog, L., Huang, S. P., Moreira, F., Nwaga, D., Pashanasi, B., Susilo, F.-X. y Swift, M. (2005) 'Belowground diversity assessment: Developing a key functional group approach in best-bet alternatives to Slash-and-Burn', in C. A. Palm, S. A. Vosti, P. A. Sanchez and P. J. Ericksen (eds) *Slash-and-Burn Agriculture: The Search for Alternatives*, Columbia University Press, New York.
- Craig, I. P., Woods, N. y Dorr, G. J. (2002) 'Aerial application', in D. Pimentel (ed) *Encyclopaedia of Pest Management*, Marcel Dekker Inc, New York.
- Di Gregorio, A. y Jansen, L. J. M. (2000) *Land Cover Classification System (LCCS): Classification Concepts and User Manual*, GCP/RA/287/ITA Africover – East Africa Project and Soil Resources, Management and Conservation Service, FAO, Rome.
- De Freitas, V. H. (2002) *Soil Management and Conservation for Small Farms; Strategies and Methods of Introduction, Techniques and Equipment*, FAO Soils Bulletin 77, FAO, Rome.

- Giller, K. E., Baere, M. H., Lavelle, P., Izac, A.-M. N. y Swift, M. J. (1997) 'Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function', *Applied Soil Ecology*, vol. 6, pp. 3–16.
- Giller, K. E., Bignell, D. E., Lavelle, P., Swift, M. J., Barrios, E., Moreira, F., van Noordwijk, M., Barois, I., Karanja, N. y Huising, J. (2005) 'Soil biodiversity in rapidly changing tropical landscapes: Scaling down and scaling up', in M. B. Usher, R. Bardgett and D. W. Hopkins (eds) *Biological Diversity and Function in Soils*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Huising, E. J. (1993) 'Land use zones and land use patterns in the Atlantic Zone of Costa Rica. A pattern recognition approach to land use inventory at the sub-regional scale using remote sensing and GIS applying an object oriented and data-driven approach', Ph.D. Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands.
- ILACO (1985) *Compendium for Agricultural Development in the Tropics and Sub-Tropics*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Iowa State University (2004) 'Weed Science', www.weeds.iastate.edu/mgmt/2004/world.shtml.
- Joshi, L., Wibawa, G., Vincent, G., Boutin, D., Akiefnawati, R., Manurung, G., van Noordwijk, M. y Williams, S. (2002) *Jungle Rubber: A Traditional Agroforestry System Under Pressure*, ICRAF-Southeast Asia Regional Research Programme, Bogor, Indonesia.
- Kuechler, A. W. y Zonneveld, I. S. (eds) (1988) *Vegetation Mapping. Handbook of Vegetation Science*, vol. 10, Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Lillesand, T. M. y Kiefer, R. W. (1987) *Remote Sensing and Image Interpretation*, John Wiley & Sons, New York.
- Molenaar, M. (1991) 'Formal data structures, object dynamics and consistency rules', in H. Ebner, D. Fritsch and C. Heipke (eds) *Digital Photogrammetric Systems*, Wichman Verlag, Karlsruhe.
- Molenaar, M. (1998) An introduction to the Theory of Spatial Object Modelling for GIS, Taylor & Francis Ltd, London.
- Oregon State University (2005) *Pacific Northwest Weed Management Handbook*, www.ippc.orst.edu/pnw/weeds.
- Ruthenberg, H., MacArthur, J. D., Zandstra, H. D. y Collinsons, M. P. (1980) *Farming Systems in the Tropics*, 3rd edition, Clarendon Press, Oxford.
- Stocking, M. and Murnaghan, N. (2001) *Handbook for the Field Assessment of Land Degradation*, Earthscan Publications Ltd., London.
- Vink, A. P. A. (1975) *Land Use in Advancing Agriculture*, Springer Verlag, Berlin WOCAT, World Overview of Conservation Approaches and Techniques, www.wocat.org/swc-meas.asp.

Colaboradores

- L. M. Abreu. Instituto de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte MG, Brazil. Imabreu@gmail.com.
- J. D. Bagyaraj. Department of Agricultural Microbiology, University of Agricultural Sciences, GKVK Campus, Bangalore, India. dbagyaraj@vsnl.com.
- D. E. Bignell. Institute for Tropical Biology and Conservation, Universiti Malaysia Sabah, 88999 Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. d.bignell@qmul.ac.uk.
- J. E. Cares. Departamento de Fitopatología, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UNB), Campus Universitario Darcy Ribeiro, Cx Postal 4457, CEP 70.904-979, Brasília, DF, Brazil. cares@unb.br.
- R. Coe. World Agroforestry Centre (ICRAF), United Nation Avenue, Gigiri, PO Box 30677-00100, Nairobi, Kenya. r.coe@criar.org.
- R. Constantino. Departamento de Zoología, Universidade de Brasília (UNB), CEP 70910-900 Brasília, DF, Brazil. constant@unb.br.
- C. Csuzdi. Systematic Zoology Research Group of Hungarian Academy of Sciences and Hungarian Natural History Museum, H-1088 Budapest, Baross str. 13, Hungary. csuzdi-alef@nhmus.hu.
- E. Franklin. Coordenação de pesquisas em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (National Institute for Amazonian Research-INPA), Cx Postal 478, CEP 69011-970, Manaus, AM, Brazil. beth@inpa.gov.br.
- S. P. Huang. (fínado), Departamento de Fitopatología, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Cx Postal 4457, CEP 70.904-970, Brasília, DF, Brazil.

- E. J. Huising. Tropical Soil Biology and Fertility (FSBF) Institute of CIAT, c/o ICRAF, United Nations Avenue, Gigiri, PO Box 30677-00100, Nairobi, Kenya. j.huising@cgiar.org.
- A. Karyanto. Faculty of Agriculture, University of Lampung, Jalan Sumantri Brojonegoro n° 1, Bandar Lampung 35145, Indonesia. asgknila@yahoo.com.
- S. Konaté. Université d'Abobo-Adjamé, B.P. 801, Abidjan 02, Côte d'Ivoire. Skonate2@yahoo.com.
- J. N. C. Louzada. Departamento de Biología (Biology Department), Universidade Federal de Lavras, Cx Postal 3037, Lavras, MG, Brazil, CEP 37200-000. jlouzada@gmail.com.
- A. Moino, Jr. Departamento de Entomología, Universidade Federal de Lavras, Cx Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Brazil. alcmoino@ufla.br.
- J. W. Morais. Coordenação de Pesquisas em Entomologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Nationale Institute for Amazonian Research-INPA), Cx Postal 478, 69011-970, Manaus, AM, Brazil. morais@inpa.gov.br.
- F. M. S. Moreira. Departamento de Ciência do Solo (Soil Science Department), Universidade Federal de Lavras, Cx Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil. CEP. fmoreira@ufla.br.
- M. van Noordwijk. World Agroforestry Centre SE Asia, PO Box 161, Bogor, 16001 Indonesia. m.van-noordwijk@cgiar.com.
- L. H. Pfenning. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras MG, Brazil. ludwig@ufla.br.
- C. Rahmadi. Zoology Division, RC Biology, LIPI Jl., Raya Jakarta-Bogor Km. 46, Cibinong, Indonesia. cahyo.rahmadi@lipi.go.id.
- N. M. Silva. Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, CEP 69070-000 Manaus, AM Brazil. nmarques@ufam.edu.br.
- S. L. Stürmer. Departamento de Ciências Naturais, Universidade Regional de Blumenau, Cx Postal 1507, CEP 89010-971, Blumenau, SC, Brazil. sturmer@furb.br.
- F. X. Susilo. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Universitas Lampung, Jalan Suantri Brojonegoro n°1, Bandar Lampung 35145, Indonesia. fxsusilo@tlkom.net.
- M. J. Swift. Tropical Soil Biology and Fertility Institute of CIAT, c/o ICRAF, United Nations Avenue, Gigiri, PO Box 30677-00100 Nairobi, Kenya. swiftmj2003@yahoo.com.
- J. E. Tondoh. UFR des Sciences et de la Nature, Centre de Recherche en Ecologie, Université d'Abobo-Adjamé, 02 BP 801, Abidjan, Côte d'Ivoire. tondohj@yahoo.fr.

R. Zanetti. Departamento de Entomologia (Entomology Department),
Universidade Federal de Lavras, Cx Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG,
Brazil. zanetti@ufla.br.

Índice analítico

A

abundancia
 macrofauna 98, 99, 126, 127, 132
 mesofauna 159, 160
 nematodos 171-172
AC. Véase análisis de correspondencia
ácaros oribátidos 150
ácaros 149-159
acceso a puntos de muestreo 84, 85
ácido láctico 156
aditivos 279, 280
África 141-142
agroecosistemas 43, 164, 217, 243, 246
agroquímicos 313, 314, 334
aislamiento 190, 194-197, 290-294
alimentación especializada o incidental
 111
almacenamiento de las muestras 78, 93,
 151, 191, 291
análisis automatizado del espaciador inter-
 génico ribosomal (ARISA) 261, 263
análisis de conglomerados (cluster) 267
análisis de correspondencia (AC) 266

análisis de varianza (ANOVA) 265
análisis filogenéticos 198, 247-248
arado 311, 334
Ascomycota 248, 252-153
Asia 140-141
atributos 297, 302-329
atributos de tamaño de unidades de
 muestreo
 campo o parcela 304-307
 cuadrícula 81-82
atributos técnico. Véase atributos
atributos técnicos específicos, de uso de
 suelo 302

B

bacteria 39, 40, 177-214, 288, 290
bacterias fijadoras de nitrógeno (BFNFNL)
 177-213
Basidiomycota 248, 251-252
bienes y servicios. Véase servicios ecosisté-
 micos
biomasa 127, 132

biopesticidas 288
bioturbación 34

C

C. Véase colonizadores
cálculo. Véase enumeración cobertura,
cultivo 305, 307
características del cultivo 301, 302, 304-
307, 319-320, 325-329
caracterización cultural 189, 190
caracterización de sitios 87-88
caracterización genética 197
cartografía, uso de suelo 81
categorías tróficas 110-112, 171-172
cercas vivas y otros elementos de vegeta-
ción 319-321, 331-332
Chromista 247
Chytridiomycota 248, 251
ciclo de nutrientes 34
clasificación de uso de suelo 332, 334-
335
clasificación de procesos 93, 94, 96, 97,
101, 102
clasificación. Véase taxonómica
clasificación, jerarquía 323
clasificadores 297, 301, 302, 304-324,
325-329
colecciones de recursos genéticos 267
Collembola 123, 124, 149-162
colonización 219-224
colonizadores (c) 172-174
combinación de cultivos 308-311, 325-329
conjunto mínimo de datos 129-132
contaminación 78
control microbiano 287
cosecha 311, 317
cPCR. Véase PCR competitivo
CSM-BGBD. Véase Proyecto, conservación
y manejo sostenible de la biodiversidad
del suelo

cuadrícula estratificada 84-85
cultivo post inundación 308
cultivos de sotobosque 308
cultivos migratorios 309, 310, 316
cultivos puros 198
cultivos secundarios 307
cultivos trampa 231-232
curvas de acumulación de especies 113,
188, 197, 265
curvas de rarefacción 265
Cylindrocladium spp. 254-255

D

D. Véase disturbio
datos requeridos y análisis 49-50, 58,
125-132, 158-160, 265-267,
302-304
densidad, cultivo 305-307
depredadores 37, 129, 164
descomposición 29-35, 37-38, 243,
246
descriptores genéricos 194
desmonte de la tierra 311, 313-315
determinación *a priori* 65, 298, 300,
303
DGGE. Véase electroforesis en gel con
gradiente de desnaturalización
diapausa 289
disección 157
diseños multiescala 64
diversidad
BFNFNL 178-182, 194
HMA 219-222, 226-232
hongos 244, 245, 265-267
macrofauna 98-100, 110
nematodos 171-172
uso de suelo 42-43, 58

E

eficiencia en la labranza 312-314
electroforesis en gel con gradiente de
 desnaturalización (DGGE) 259-260,
 263
embudo de extracción 149, 152-155
enfermedad 35, 36, 287, 312, 315, 317,
 319
enfoque sesgado 65
enfoques transversales 57
ensamble de especies 110
ensayo de reducción de acetileno (ERA)
 185, 189, 191
enumeración 168, 190, 193
equidad 266
ERA. Véase ensayo de reducción de
 acetileno
escala 62
escalas espaciales de muestreo 42-50, 70,
 85-86
escarabajos 100-113, 116-125, 140
especies anécicas 100, 128
especies clave 129
especies endógenas 99, 128
especies epigeas 78, 99, 128
especies trampa 185-186
esporas 88, 218, 226-228, 229-231,
 288
esquemas de muestreo alternativos 57-
 89, 94-100
esquemas de puntos de muestreo 72-75
estacionalidad 88, 98
estándares para BFNFL descripción de
 especies 194-196
estatus de los cultivos 318
estratificación en el muestreo 55-57, 65-
 67, 71
etiqueta 97, 104, 192, 283
extracción
 DNA 197, 162, 257
 esporas de HMA 226-228

método de Berlese 152-154
método de extracción Winkler 92,
 114-118, 132
nematodos 165-166
extracciones núcleo por núcleo 154

F

factor tiempo de cultivo 309, 322-323,
 330-333
familia Acaulosporaceae 238
familia Archaeosporaceae 239
familia Gigasporaceae 240
familia Glomeraceae 236
familia Pacisporaceae 239
familia Paraglomeraceae 239
fase de pupa 284
fauna de la hojarasca 37, 110-111, 112-
 125, 128
fertilizantes 314-316, 317
fertilizantes inorgánicos 315
fijación de nematodos 165-169

G

glomerales 220
Glomeromycota 247
gradientes, muestreo 80-81
gremios 114-115
grupos funcionales 29-41, 99-100, 113,
 115-117, 130, 163-165
grupos funcionales de la biota del suelo
 38-41

H

herbívoros 37
hidróxido de potasio (KOH) 156
hipótesis de CSM-BGBD 57

HMA. Véase hongos micorrizógenos arbusculares
hongos
 entomopatógenos 287-294
 esquema de medición por puntos 74
 grupos funcionales 39, 41
 HMA 217-241
 patógenos de plantas y saprofitos 41, 243-280
hongos antagonistas 41
hongos del suelo, patógenos de plantas 41, 243-280
hongos saprofitos 41, 243-280
hongos fitopatógenos 41
hongos micorrizógenos 217-241
hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) 41, 217-241
hormigas 40, 91-92, 100-113, 114-118, 140
hospederos promiscuos 178-185, 185-187
huella molecular 196-198, 259-260, 263-264

I

identificación
 grupos funcionales en macrofauna 112-113
 HMA 226-228, 229-230
 hongos 255-256
 lombrices de tierra 98-100
 macrofauna 105-110, 140-144
 mesofauna 156-159
 moscas de la fruta 284-285
 nematodos 163-165, 166-168
 organismos entomopatógenos 290, 293. Véase también taxonomía
IM. Véase índice de madurez
imágenes satelitales 67, 306
índice de diversidad de Shannon 171

índice fitoparasítico (IFP) 172-174
índice de madurez (IM) 172,173
índice de riqueza de género 171
índice de Shannon-Wiener 266
infiltración de glicerina 168
ingenieros del ecosistema 34, 37, 91, 129
inoculación 47, 217, 193
insectos 287-294
intensidad de uso de suelo
 agrícola 42, 46
 datos requeridos 48-50
 descripción y clasificación 299, 301, 305-306, 330-336
inventarios 41-50, 53, 87-88, 297-336
investigaciones piloto 60
irrigación 308, 317

J

jarras de Leonard 186, 187, 193
jerarquía
 clasificación 323
 clasificación de uso de suelo 300-302, 302-304
 manejo de la biota del suelo 47-49
 muestreo 79-80
 replicación y tamaño de muestra 60-65

L

labranza 312, 313, 334
labranza mínima 312
LCCS. Véase Sistema de clasificación de cobertura de suelo
límites, muestreo de 63, 64, 304, 310
limpieza de malezas 313-315
listas de especies 107-109
lombrices de tierra 40, 44, 91,93-100, 100-113

M

macrofauna 39, 40, 73, 75-77, 91-148
manejo 311-319, 321-330
materia orgánica 29-35
materia orgánica del suelo (MSO) 34, 54, 58
mecanismos de control 313-315
mecanización 311, 334
media poblacional 25
medidas de conservación 318
"medio 79" 214
medio "S" 293
medio selectivo, para hongos 252-255
mesofauna 39, 40, 73, 114-118, 118-125, 149-160
método de Berlese 149-160
método de Berlese modificado 154-155
método de centrifugación en azúcar 166
método de extracción 190, 249, 290
método de filtración de partículas 252-254, 263-264
método de la cuadrícula de intersección 227-228
método de partículas de suelo 251-253
método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 196, 197, 256-259, 260, 261, 263
método de Seinhorst 168
método de Seinhorst modificado 169
método Winkler 92, 114-118, 130
métodos de extrapolación 105
métodos de montaje 157-158, 229-230
métodos TSBF 93-94
microfauna 37-38, 39, 40, 73
microhabitat 47, 48-49
monolitos 94-100, 131
 monolitos complementarios para lombrices de tierra 97
moscas de la fruta 281-286

muestras compuestas 61-65, 193
muestras control 193, 214
muestreo dentro de una parcela 65
muestreo
 animales 39
 BFNFNL185-189, 193-195
 clasificación de usos de suelo 297-336
 diseño y estrategias 53-90
 hongos 249
 inventarios de biodiversidad 42-47
 macrofauna 91-148
 mesofauna 149-162
 moscas de la fruta 282-285
 muestreo adaptativo 64, 84-85
 nematodos 165
 punto de muestreo 62-63
muestreo aleatorio 55-56
muestreo en cuadrícula
 clasificación de uso de suelo 304
 CSM-BGBD 79-80, 82-83, 84-85
 paisajes 61-63
 aleatorio y sistemático 67-68
muestreo en transectos
 monolitos para lombrices de tierra 97
 macrofauna 75, 98-100, 118, 126, 131
 número de muestras 81-83
 esquema de puntos de muestreo 72-75
muestreo estratificado 67, 97
muestreo no aleatorio 67
muestreo secuencial 64
muestreo simple aleatorio (MSA) 55, 56, 67-68
muestreo sistemático 67-68

N

nematodos 163-176, 287-295
nematodos bacteriófagos 164
nematodos omnívoros 164

nematodos parásitos de plantas 164
nematos micofagos 164
nicho, subparcela o microhabitat 47, 49
nitrogenasa 184, 191
nivel de nicho 47, 49, 102
nivel de parche 46–47, 49
nivel neotropical 142, 145, 147–148
nivel regional 44, 140–144
nomenclatura 106, 126
número más probable (NMP) 218, 219–224

O

observación directa 302
observaciones secundarias 303
Oomycota 250
organismos entomopatógenos 287–295
organismos mutualistas 39

P

p. Véase persistencia
paisajes 44–47, 48, 61–62
parcelas de muestreo y clasificación de uso de suelo 46–47, 48–49, 64–65, 79–80, 81, 300–336
patógenos fúngicos de plántulas 255
perturbación (P) 56, 78, 126, 165, 218, 330
PCR competitivo (cPCR) 262
PCR cuantitativo 261–262
PCR. Véase Método de reacción en cadena de la polimerasa
permanencia de la vegetación 330–332
persistencia (p) 172, 174
pesticidas 286, 314
Phytophthora spp. 250
plagas 35, 38, 315, 317, 319
plantaciones 322–324

plantaciones de teca 328
plantas hospederas 178–182, 184–186, 219
población, muestreo 60–62
polimorfismo de conformación de cadena única (SSCP) 261, 263
polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) 260
polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) 260, 263
prácticas culturales 301, 307–311, 325, 328, 329
preparación de la tierra 311–312
primers específicos para “hongos” 257–258
principales grupos funcionales 35–38, 41
procedimientos basados en cultura 333–245, 249–255
proceso de aclarado 156–157
procesos de degradación 44
procesos de rehabilitación 44
productores primarios 37
programa Africover 299
propágulos infectivos 219–224
protozoa 247
proyecto, Conservación y manejo sostenible de la biodiversidad del suelo (CSM-BGBD) 45–47, 57, 79–89, 185–198, 244, 298
prueba de hipótesis 55–57, 63
prueba piloto 60
pseudo-replicas 62
puntos de medición 53
puntos de muestreo 74
puntos de muestreo, separación de 85–86
puntos, muestreo 81, 83–84, 85–86, 132
Pythium spp. 250

R

reactivo de Melzer 230-231
reglas de decisión para la clasificación de usos del suelo 323
rendimiento, medición del estatus de los cultivos 318-319
resguardo de especímenes 192-193, 285
respuestas multivariadas de interés 63-64
RFLP *ver* polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
rhizobia 177-183
Rhizoctonia spp. 251
Ricinius communis 254-255
riqueza de especies 265-267, 297-299
rizosfera 249
rotación, cultivos 310-311
roundup 314

S

secuencia de cultivos 107
secuenciación 16S rDNA 196
selección subjetiva 67
servicios ecosistémicos 29-36, 41, 163
sistema de clasificación de cobertura de suelo (LCCS) 299
sistemas de barbecho 309-310, 334, 335-336
sistemas de cultivo 42, 300-302, 304-319, 325, 328, 329
sitios de muestreo 60-63, 79
solución de nutrientes Jensen's 215
solución Nesbitt 158
SSCP. *Véase* Polimorfismo de conformación de cadena única
sustancias químicas 156-158

T

tasas de aplicación 303, 314-316, 317
taxonomía
BFNFNL 177-182
HMA 219-222, 229-230
macrofauna 105
mesofauna 158-159
moscas de la fruta 281, 284
neotropical 145
Véase también identificación
visión general 29, 30-33, 36-41
técnica de infección de plantas 178, 188-189
técnicas de cebo 119, 124, 249-252, 253-255, 279-280
técnicas de lavado para partículas del suelo 252, 263
técnicas de preservación 267
técnicas de preservación 93-94, 103-105, 267
técnicas de procesamiento de muestras 78, 82, 93-95, 103, 123, 124, 155-158
técnicas específicas de DNA 197, 256-265
termitas 40, 91, 100-113, 126, 140, 145, 147
termitas que se alimentan de madera 111
termitas que se alimentan del suelo 110
TGGE. *Véase* electroforesis en una matriz de gel con un gradiente lineal térmico (TGGE) 259-260, 263
tinción de raíces 224-226, 227
tipos de anidación 112-113
trampa de especies múltiples 185-187
trampas
McPhail 282
BFNFNL 190
pitfall 118-125, 130-132, 149
trampa 118-125, 130-132, 149
trampa White 293

trampas sin cebo 118
transecto de entrenamiento 102
transformación de datos 126, 159-160
transformadores procariotas 38
T-RFLP. Véase polimorfismo de longitud de
fragmentos de restricción terminal
trituradores 260

U

uso de suelo
a priori definición de clases descriptivas
65, 298, 300, 303
BFNFNL 186
cartografía 81
definición de clases 321-324
descripción y clasificación 297-336
diversidad 42, 58
hongos 243
inventarios 87-88
muestreo 65-67, 83-84
Véase también intensidad de uso de
suelo
área de uso de suelo 46, 48

V

valores cp 171-174
variabilidad 70-72
variabilidad de datos 44, 64, 70-72, 83,
87
variabilidad intragrupo 51
vegetación leñosa 319, 320-322
vegetación semi-permanente 331
vegetación, efectos de mitigación 301,
331-333
ventanas para muestreo 60, 61-62, 79-
81, 132

W

WOCAT *World Overview of Conservation
Approaches and Technologies* 318

Z

Zygomycota 248

Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo, editado por Fátima M. S. Moreira, E. Jeroen Huising y David E. Bignell se terminó de imprimir durante el mes de mayo de 2012 en los talleres gráficos PROAGRAF, S.A. de C.V. Av. 20 de Noviembre No 649, Col. Badillo, C. P. 91190, Xalapa, Veracruz, México.
Tel/FAX (228) 890 6204/815 1876
www.proagraf.com.mx

Se tiraron 1,000 ejemplares

