



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas

IMPACTO DE LOS USOS DEL SUELO SOBRE LA VARIABILIDAD
GENÉTICA DE LA FAUNA EDÁFICA

MSc. Mónica Díaz Porres

DIRECTOR: Dr. Pedro José Fernández Iriarte

CODIRECTOR: Dr. José Camilo Bedano

Río Cuarto, Abril de 2016

COMISIÓN ASESORA

Dra. Analía Rosa Becker

Universidad Nacional de Río Cuarto

Dr. Pablo Antonio Martínez

Universidad Nacional de Mar del Plata

Dra. María Isabel Remis

Universidad de Buenos Aires

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Universidad Nacional de Río Cuarto, 15 de abril de 2016

Calificación:.....

JURADO

Firma..... Aclaración

Firma..... Aclaración

Firma..... Aclaración

A Federico

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a las distintas personas que participaron desde el comienzo en la realización de esta tesis:

A Fernando Momo, con quien inicié este camino..., por su confianza, aliento, y por su valiosa asesoría en la construcción del conocimiento.

A Pedro Fernández Iriarte por su orientación y colaboración durante todo el proceso.

A José Camilo Bedano por todas sus gestiones, la orientación y la buena onda.

A Macarena Rionda por su colaboración y acompañamiento durante los muestreos, trabajo en el laboratorio, análisis de resultados y, sobretodo, por su motivación.

A Enrique “Quique” Madrid por su colaboración en la optimización de las PCR.

A María Isabel Remis, Pablo A. Martínez y Analía R. Becker por sus comentarios y sugerencias para mejorar la tesis.

Al personal y compañeros del Instituto de Ciencias de la Universidad Nacional de General Sarmiento, mi lugar de trabajo durante la beca; asimismo a mis compañeras de laboratorio Karina Aguilar, Luciana Fueyo y Angélica María Ramírez.

A todos mis compañeros del Programa de Investigación en Ecología Terrestre (PIET) y a los demás miembros del Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable (INEDES–CONICET) de la Universidad Nacional de Luján.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y a la Universidad Nacional de Luján por la financiación recibida a través del Programa de Formación de Doctores en Áreas Tecnológicas Prioritarias (PFDT – PRH No. 19) para la realización de este proyecto de tesis; asimismo al CONICET por la Beca interna de finalización del Doctorado otorgada.

A la Familia Carey, dueños del predio Etchegoyen, y a la Universidad Nacional de Luján por permitir la realización de los muestreos en sus campos.

A mi Oriz, mi esposo y mi compañero de la vida, por su paciencia, amor y comprensión, por escucharme y levantarme el ánimo en los momentos difíciles, por impulsarme a alcanzar mis metas, por brindarme tranquilidad y compartir tantas cosas conmigo...

A mi Federico, mi motor y mi motivación...

A mi Papá por su amor, dedicación y respaldo incondicional, por todos sus esfuerzos y sacrificios para acompañar a sus hijos en este andar.

A mis hermanas Diana y Dora Luz y a mi hermano Norman David por su acompañamiento a la distancia y por su apoyo en este y todos los momentos de mi vida.

A mis familiares y amigos que ya no están, pero que viven en mi memoria y de los cuales tengo los más gratos recuerdos (*QEPD*).

Resumen

Los ecosistemas pampeanos son reconocidos por su alta fertilidad y productividad, lo que hace a sus suelos aptos para el uso agrícola. Sin embargo, la intensificación de las actividades agrícolas durante los últimos cuarenta años ha provocado un intenso régimen de perturbación, caracterizado por el incremento en la tasa de degradación de los suelos y sus funciones. La degradación del suelo y su relación con las comunidades de fauna edáfica se han vuelto relevantes para el manejo del recurso. En el trabajo desarrollado en esta tesis, se ha demostrado que dos usos del suelo diferentes (ganadero y agrícola), comparados con pastizales naturalizados, presentan cambios en las propiedades físicas y químicas del suelo, en la estructura de las comunidades de artrópodos y en la variabilidad genética de una especie elegida como modelo biológico. En particular, se hizo énfasis en este último aspecto teniendo en cuenta que la variabilidad y la estructura genética de una especie pueden dar cuenta de procesos de diferente alcance histórico o temporal. Se analizaron la diversidad y la estructura genética poblacional de *Armadillidium vulgare*, el “bicho bolita”, utilizando marcadores moleculares ISSRs. Los resultados mostraron que en los usos agrícolas de ambos campos estudiados, la diversidad genética es menor respecto a los otros dos usos, y que existe diferenciación genética entre las poblaciones y cierto grado de endogamia. El nivel de variación genética detectado en los usos agrícolas podría indicar que estos grupos pertenecen a poblaciones de menor tamaño, sometidos a un régimen de mayor perturbación sostenido por largos periodos de tiempo. Entretanto, la diferenciación genética entre los grupos asentados en los usos agrícola y naturalizado podría sugerir la importancia de los cuellos de botella y/o los efectos combinados de la deriva genética y la migración. Se observó también que el cambio de sistemas naturalizados a sistemas agrícolas y pecuarios, implicó una disminución en la riqueza y densidad de grupos de artrópodos edáficos y un deterioro en la calidad física y química del suelo.

Palabras clave: Usos del suelo, Fauna edáfica, Comunidad de artrópodos, Variabilidad genética, Diferenciación y estructura genética, *Armadillidium vulgare*, ISSR-PCR.

Abstract

The Pampas ecosystems are recognized by their high productivity and fertility, making their soils suitable for agricultural use. However, agricultural activities intensification during the last 40 years, has led to an intense disturbance regime, characterized by the increase in the soils degradation rate and soil functions. Soil degradation and its relationship with the soil fauna communities has become relevant to resource management. In this work it has been shown that two different soil uses (livestock and agricultural), compared to naturalized grasslands, have changes in soil physical and chemical properties, in the arthropod communities structure, and the genetic variability of a species chosen as a biological model. In particular, emphasis was placed on the latter taking into account that variability and genetic structure of a species can account for processes of different historical or temporal scope. Diversity and population genetic structure of the woodlouse, *Armadillidium vulgare*, were analyzed using ISSR-PCR. The results showed that in agricultural uses, genetic diversity is lower compared to the other two uses, and there is genetic differentiation among populations and some inbreeding degree. The genetic variation level detected in agricultural use could indicate that these groups belong to smaller populations, placed under a greater disturbance sustained for long time periods. While, genetic differentiation among agricultural uses groups and naturalized groups might suggest the importance of bottlenecks and/or the combined effects of genetic drift and migration. It was also noted that the change of naturalized systems to agricultural and livestock land uses, resulted in a decrease in richness and density of soil arthropod groups, and a decline in the soil physical and chemical quality.

Key words: Land uses, Soil fauna, Arthropods community, Genetic variability, Genetic differentiation, Genetic structure, *Armadillidium vulgare*, ISSR-PCR.

ÍNDICE

	Página
Resumen	vi
Abstract.....	vii
Índice de Tablas.....	x
Índice de Figuras	xi
Capítulo 1. Introducción General	1
1.1 Agricultura en la región Pampeana Argentina	2
1.2 Fauna edáfica en agroecosistemas	3
1.3 Isópodos terrestres: <i>Armadillidium vulgare</i> (Latreille, 1804)	5
1.4 Propiedades físicas y químicas del suelo.....	7
1.5 Diversidad y estructura genética en comunidades edáficas.....	9
Capítulo 2. Materiales y Métodos	13
2.1 Área de Estudio	14
2.2 Muestreos y mediciones de campo.....	22
2.3 Análisis de la variabilidad genética de <i>Armadillidium vulgare</i>	23
2.3.1 Muestreo de <i>A. vulgare</i>	23
2.3.2 Extracción de ADN	23
2.3.3 ISSR-PCR y electroforesis	24
2.4 Comunidad de artrópodos del suelo	26
2.4.1 Macroartrópodos	26
2.4.2 Microartrópodos	26
2.5 Parámetros físicos y químicos del suelo.....	27
2.6 Análisis de la información.....	29
2.6.1 Análisis de datos moleculares	29
2.6.2 Comunidad de artrópodos edáficos y características del suelo.....	33
Capítulo 3. Análisis de la variabilidad genética de <i>Armadillidium vulgare</i> (Latreille, 1804) en diferentes usos del suelo	35
3.1 Introducción.....	36

3.2 Resultados.....	38
3.2.1 Variabilidad genética.....	39
3.2.2 Distancias genéticas	42
3.2.3 Diferenciación y estructura genética	47
 Capítulo 4. Comunidad de macro y microartrópodos del suelo y propiedades físicas y químicas del suelo	54
4.1 Introducción.....	55
4.2 Resultados.....	57
4.2.1 Comunidad de artrópodos del suelo	57
4.2.2 Propiedades físicas y químicas del suelo	67
4.2.3 Relaciones entre la comunidad de artrópodos y los atributos del suelo.....	73
 Capítulo 5. Discusión y Conclusiones	76
5.1 Conclusiones.....	90
5.2 Consideraciones finales	92
 Bibliografía.....	93
 Apéndices	107
Apéndice 1. Descripción de los marcadores ISSR	108
Apéndice 2. Perfiles de amplificación de <i>Armadillidium vulgare</i> con los marcadores ISSR.	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características físicas, físico-químicas y químicas de los horizontes de suelo de la Serie 2, presente en el área de estudio.....	18
2. Rotación de cultivos en el período 2008–2014 para los usos ganadero (G) y agrícola (A) de UNLu y Etchegoyen.....	20
3. Labores e insumos aplicados en los suelos con uso ganadero (G) y agrícola (A) en UNLu y Etchegoyen en los períodos de muestreo.....	21
4. <i>Primers</i> ISSR y temperaturas de alineación usadas en la PCR.....	25
5. Descriptiva para datos de marcadores.....	38
6. Patrón de bandas de los marcadores ISSR analizados en 215 individuos de <i>A. vulgare</i> en diferentes usos en UNLu ($n= 117$) y Etchegoyen ($n= 98$).....	39
7. Diferenciación genética de <i>A. vulgare</i> entre usos dentro de cada sitio, estimados usando los índices F_{ST} y Φ_{PT}	47
8. Resumen del Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) para los grupos de <i>A. vulgare</i> en UNLu y Etchegoyen.....	48
9. Niveles de diferenciación genética (θ^{II}) de <i>A. vulgare</i> estimados por análisis Bayesiano.....	50
10. Densidad (individuos/m ²) y número de grupos taxonómicos de la comunidad de macroartrópodos del suelo en los sistemas naturalizado (N), ganadero (G) y agrícola (A) de UNLu y Etchegoyen.....	59
11. Riqueza observada (S) y estimada ($S1$; Chao) de la comunidad de microartrópodos del suelo en los sistemas naturalizado (N), ganadero (G) y agrícola (A) de UNLu y Etchegoyen.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Vórtice de extinción; cuando una población es muy pequeña, los fenómenos estocásticos incrementan el efecto de los problemas genéticos.....	10
2. Localización geográfica del Partido de Luján y de los sitios de estudio, UNLu y Etchegoyen, en la Provincia de Buenos Aires, Argentina.....	15
3. Precipitación mensual (mm) y temperaturas máxima y mínima (°C) para el área de estudio durante el período 2009–2013.....	16
4. Localización de los lotes de muestreo en el campo experimental de la Universidad Nacional de Luján.....	17
5. Localización de los lotes de muestreo en el predio rural privado Etchegoyen...	19
6. Diversidad genética (h) en UNLu (A) y Etchegoyen (B).....	40
7. Índice de información de Shannon (I) en UNLu (A) y Etchegoyen (B).....	41
8. Análisis de Coordenadas Principales (PCo) basado en la distancia genética Nei & Li (1979) entre pares de individuos de <i>A. vulgare</i> en UNLu.....	42
9. Análisis de Coordenadas Principales (PCo) basado en la distancia genética Nei & Li (1979) entre pares de individuos de <i>A. vulgare</i> en Etchegoyen.....	43
10. Árbol NJ basado en las distancias genéticas entre pares de individuos de <i>A. vulgare</i> en UNLu.....	44
11. Árbol NJ basado en las distancias genéticas entre pares de individuos de <i>A. vulgare</i> en Etchegoyen.....	45
12. Test de Mantel UNLu.....	46
13. Test de Mantel Etchegoyen.....	46
14. ΔK calculado por el método de Evanno <i>et al.</i> (2005) para UNLu (A) y Etchegoyen (B).....	51
15. Patrones de diferenciación genética observados en <i>A. vulgare</i> en UNLu mediante el análisis Bayesiano de estructuración ($k = 7$).....	52
16. Patrones de diferenciación genética observados en <i>A. vulgare</i> en Etchegoyen mediante el análisis Bayesiano de estructuración ($k = 2$).....	52
17. Densidad total (individuos/m ²) de macroartrópodos del suelo.....	58

18. Proyección de los sistemas en el plano factorial de los dos primeros componentes principales para la densidad de grupos de macroartrópodos del suelo.....	61
19. Densidad total de Acari (individuos/m ²).....	63
20. Abundancias relativas de los taxones de Acari.....	64
21. Densidad total de Collembola (individuos/m ²).....	64
22. Abundancias relativas de los órdenes de Collembola.....	65
23. Proyección de los sistemas en el plano factorial de los dos primeros componentes principales para la densidad de grupos de microartrópodos del suelo.....	66
24. Densidad aparente (g/cm ³).....	67
25. Humedad gravimétrica del suelo (%).....	68
26. Contenido de materia orgánica del suelo (%).....	69
27. Nitrógeno total del suelo (%).....	70
28. Relación carbono/nitrógeno del suelo.....	71
29. Proyección de los sistemas en el plano factorial de los dos primeros componentes principales para las propiedades físicas y químicas del suelo.....	72
30. Correlación Canónica entre variables físicas y químicas y la densidad de grupos taxonómicos.....	73
31. Gráfico de la correlación entre la matriz de interacción entre 18 grupos faunísticos y 6 ambientes versus la matriz de 5 covariables ambientales.....	75
32. Niveles de organización analizados en el trabajo de tesis.....	78
33. Relaciones entre la diversidad y diferenciación genética de <i>A. vulgare</i> , la comunidad de artrópodos y los atributos del suelo.....	89
A1. Amplificación con un <i>primer</i> (CA) _n anclado en el extremo 5' con tres nucleótidos extras.....	108
A2. Perfil de amplificación de <i>A. vulgare</i> usando el <i>primer</i> ISSR 1 (CA) ₇ AC.....	110
A3. Perfil de amplificación de <i>A. vulgare</i> usando el <i>primer</i> ISSR 3 (CA) ₇ AG.....	110
A4. Perfil de amplificación de <i>A. vulgare</i> usando el <i>primer</i> ISSR 7 (AC) ₈ G.....	111
A5. Perfil de amplificación de <i>A. vulgare</i> usando el <i>primer</i> ISSR 8 (AG) ₈ T.....	111

Capítulo 1

Introducción General

1.1 Agricultura en la región Pampeana Argentina

La Pampa Argentina, zona con más de 50 millones de hectáreas localizada al centro–este del territorio nacional, se caracteriza por su alta fertilidad y productividad, lo que hace a sus suelos aptos para el uso agrícola. Esta región ha experimentado un proceso de “agriculturización” durante los últimos cuarenta años, caracterizado por la expansión de la superficie cultivada sobre los ecosistemas naturales (Pengue, 2005), y el reemplazo de los usos tradicionales de la tierra, como la rotación de la agricultura con la ganadería, por cultivos anuales. Este incremento se asoció con cambios tecnológicos, el auge del monocultivo de soja transgénica, la utilización de la siembra directa como sistema de manejo del suelo, la intensificación de la ganadería y su desplazamiento a zonas extrapampeanas y, con nuevos modelos de gestión empresarial que permitieron la concentración productiva (Manuel-Navarrete *et al.*, 2007). Como resultado de estas tendencias, la región pampeana está sometida a un intenso régimen de perturbación, caracterizado por el incremento en la tasa de degradación de los suelos, recurso no renovable en tiempos ecológicos (Viglizzo *et al.*, 2001; Viglizzo *et al.*, 2011).

Está bien documentado que la sustitución de las coberturas vegetales naturales para establecer sistemas de producción intensivos, trae como consecuencias el deterioro del suelo, la lixiviación y agotamiento de nutrientes, la disminución de la capacidad productiva de los agroecosistemas y la reducción de la biodiversidad y sus funciones (Barrios, 2007). En la estepa herbácea de la Pampa Argentina, el incremento del cultivo de soja (*Glycine max*) en las últimas décadas aumentó abruptamente la demanda de fitosanitarios (Aizen *et al.*, 2009; Viglizzo *et al.*, 2011). Los plaguicidas utilizados para el control de las poblaciones que causan daños a los sistemas agropecuarios, afectan también a organismos benéficos como parasitoides, depredadores de plagas y a la fauna asociada con diferentes funciones ecológicas del suelo (Decäens *et al.*, 2003). Estos compuestos pueden causar en la fauna benéfica efectos agudos y producirles la muerte, o efectos subletales que alteran la fisiología o el comportamiento de los organismos (Desneux *et al.*, 2007).

1.2 Fauna edáfica en agroecosistemas

La fauna edáfica es un importante componente de los suelos en ecosistemas naturales y agroecosistemas, participa en la regulación de procesos como la fragmentación y descomposición de la materia orgánica y reciclaje de nutrientes, modifica la estructura del suelo y regula la actividad de otros organismos (Coleman *et al.*, 2004). Entre las comunidades de invertebrados del suelo se encuentra la macrofauna, organismos con diámetro corporal mayor de 2 mm o longitud mayor de 10 mm, que desarrollan todo o parte del ciclo de vida en el suelo o en el mantillo (Coleman *et al.*, 2004; Lavelle *et al.*, 2006). Los macroartrópodos del suelo incluyen, entre otros, a los taxones Arachnida, Diplopoda, Chilopoda, Isopoda, Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Dermaptera y sus estados larvales (Velásquez *et al.*, 2007). Las larvas de lepidópteros se alimentan de material vegetal vivo (herbívoros), los arácnidos, formícidos, quilópodos y algunos escarabajos son depredadores, y algunas especies de hormigas son omnívoras, mientras que los isópodos y diplópodos son principalmente detritívoros (Brussaard *et al.*, 1997; David & Handa, 2010).

Otro de los componentes de la fauna edáfica son los microartrópodos, organismos con diámetro corporal menor de 2 mm, entre los que se encuentran principalmente los ácaros y los colémbolos (Coleman *et al.*, 2004). A diferencia de la macrofauna, estos organismos no son capaces de cavar en el suelo, por lo tanto están confinados en sus poros (Fredes *et al.*, 2009). Los ácaros en el suelo están representados por cuatro taxones: el orden Mesostigmata, los subórdenes Prostigmata y Oribatida, y la Cohorte Astigmata (incluida actualmente en Oribatida; Pérez *et al.*, 2014). Los Mesostigmata son mayoritariamente depredadores, los Prostigmata son el grupo más diversificado y pueden ser fungívoros o predadores, los Oribatida son principalmente fungívoros, y los Astigmata son bacteriófagos y fungívoros (Paoletti *et al.*, 2007; Arolfo *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2014).

Por su parte, los colémbolos son pequeños hexápodos, parientes de los insectos pero sin alas, que ahora son considerados como una clase separada (Palacios-Vargas, 2014). Son comunes y abundantes en diferentes microhábitats, registrando densidades por encima de 100000 individuos/m² (Hopkin, 1998). Los colémbolos son panfitófagos y se pueden alimentar de materia orgánica en descomposición, por lo que son considerados detritívoros, aunque dependiendo de las condiciones, sus preferencias alimenticias pueden variar. Sin

embargo, la mayoría ingiere polen, algas, esporas y micelios de hongos (Endlweber *et al.*, 2006; Palacios-Vargas, 2014). Dentro del grupo se encuentran taxones susceptibles a las variaciones ambientales, es decir que sólo han sido encontrados en situaciones ecológicas que no variaron bruscamente. Esta característica indicadora de los Collembola es uno de los motivos por los que se les ha estudiado en situaciones sometidas a impacto antrópico (Bernava & Palacios-Vargas 2008; Momo & Falco, 2009).

La fauna del suelo también se puede clasificar de acuerdo con la localización en el perfil del suelo, los recursos alimenticios que explotan y el papel funcional en el ecosistema. En este sentido, Lavelle *et al.* (1997) determinaron tres categorías ecológicas o grupos funcionales que reflejan las estrategias adaptativas, reconociendo los organismos epigeos, anécicos y endógeos, que de acuerdo con la posición en el suelo, cumplen un papel diferencial en los procesos de descomposición de la materia orgánica. Como la fauna epigea vive y se alimenta de los detritos en la superficie del suelo, es más susceptible a los cambios edafoclimáticos y al manejo de los agroecosistemas. Algunos sistemas de cultivo tradicionales ofrecen condiciones favorables para la conservación de la fauna edáfica, la recolonización y multiplicación natural de las especies (Feijoo *et al.*, 1999). Factores como la disponibilidad de recursos alimenticios, condiciones microclimáticas, propiedades químicas y estructura del suelo, así como la vegetación, uso y manejo de la tierra y las interacciones bióticas con otros organismos, pueden afectar significativamente el tamaño, la composición y la distribución de las comunidades (Paoletti & Bressan, 1996).

El papel de los organismos del suelo ha recibido poca atención, porque los servicios de éstos como ingenieros de los ecosistemas, fragmentadores de la hojarasca y reguladores del estrés biótico, han sido reemplazados por operaciones técnicas dependientes de fuentes no renovables de energía (Barrios, 2007). Sin embargo, la diversidad, número y funciones de los invertebrados del suelo son sensibles al estrés y al cambio ambiental, asociados con la labranza, la aplicación de fertilizantes y plaguicidas, quemas, talas y otras prácticas de cultivo que impactan a las comunidades faunísticas del suelo, por la alteración de las entradas de materia orgánica y la modificación de microhábitats en términos de la calidad física y química de los suelos (Bedano *et al.* 2006a; 2006b). La magnitud de los efectos del uso del suelo sobre la edafofauna depende del tipo de uso, del sistema de siembra (convencional o directa), de la diversidad y rotación de los cultivos y de los insumos utilizados (Aquino *et al.*, 2008a).

1.3 Isópodos terrestres: *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804)

Dentro de la fauna edáfica, los isópodos terrestres se consideran potenciales bioindicadores de la calidad de suelos y agroecosistemas por su amplia distribución geográfica (cosmopolitas), fácil identificación taxonómica y por ser el componente dominante en el gremio de los detritívoros en regiones templadas (Coleman *et al.*, 2004; Sfenthourakis *et al.*, 2005; Paoletti *et al.*, 2007; David & Handa, 2010, Hornung *et al.*, 2015). Los isópodos habitan la capa de hojarasca, y al fragmentarla, facilitan el proceso de descomposición y el ciclaje de nutrientes. Como consecuencia, los isópodos terrestres afectan indirectamente la actividad y composición de las comunidades de microflora del suelo (Hassall *et al.*, 1987; Lavelle *et al.*, 1997; Frouz *et al.*, 2008; Špaldoňová & Frouz, 2014; Jia *et al.*, 2015).

Armadillidium vulgare (Latreille, 1804; Isopoda: Oniscidea), “bicho bolita” como se le conoce popularmente, es una especie común, miembro de la macrofauna saprófaga del suelo, aunque ocasionalmente puede comportarse como fitófago (Warburg, 1968). Es nativo de las orillas del Mediterráneo y ha sido introducido en casi todo el mundo, donde se ha registrado en áreas conservadas y sistemas agropecuarios (Paoletti & Hassall, 1999; Paoletti *et al.*, 2007; Hornung *et al.*, 2007; Beauché & Richard, 2013; Hornung *et al.*, 2015), en particular con poblaciones densas en zonas templadas. *A. vulgare* puede alcanzar densidades de hasta 10000 individuos/m² y puede consumir cantidades significativas de hojarasca, produciendo así grandes cantidades de partículas fecales (Zimmer, 2002; Frouz *et al.*, 2008; Špaldoňová & Frouz, 2014). Las poblaciones de *A. vulgare* son fuertemente dependientes de las condiciones edáficas y son reconocidas por seleccionar microhábitats acordes a sus preferencias de humedad (Warburg *et al.*, 1984; David & Handa, 2010). Los hábitats óptimos para la especie tienen abundante materia orgánica en descomposición, temperaturas moderadas, baja iluminación y moderada a alta humedad para impedir la desecación.

Las poblaciones de *A. vulgare* se reproducen una vez al año en el hemisferio norte y dos a tres veces en el hemisferio sur. La temporada de apareamiento dura desde finales de la primavera hasta principios del verano, mientras que la temporada de eclosión termina a principios del otoño. El período de gestación dura de ocho a doce semanas, con promedio de descendencia de 100 individuos. Tanto las hembras como los machos, alcanzan la madurez sexual o reproductiva a la edad de un año. Los individuos de *A. vulgare* tienen un promedio

de vida de un año y medio, aunque algunos pueden sobrevivir hasta dos años (Beauché & Richard, 2013).

Las poblaciones de *A. vulgare* se caracterizan por su limitada capacidad de migración (Homor *et al.*, 2003). Paris (1963) registró que los organismos de esta especie pueden recorrer entre uno y trece metros por día; además, tienen una inherente tendencia a agregarse (Warburg *et al.*, 1968), lo que puede limitar la dispersión. La limitada habilidad de locomoción de estos organismos, asociada con su estilo de vida en el suelo, sugiere la existencia de poblaciones altamente estructuradas. Sin embargo, los mecanismos pasivos de dispersión, como el viento o el agua, han sido implicados en los movimientos de larga distancia de los isópodos terrestres, y por lo tanto, el flujo génico puede ser suficiente para prevenir la diferenciación genética (Costa *et al.*, 2013).

Las poblaciones de *A. vulgare* son muy sensibles a la aplicación de plaguicidas y a las prácticas de labranza, mostrando diferencias en la densidad entre cultivos convencionales y orgánicos, y diferencias en la biomasa, siendo más alta bajo condiciones de labranza cero o labranza mínima (Paoletti & Hassall, 1999). Los insecticidas y herbicidas aumentan las tasas de mortalidad y disminuyen las tasas de crecimiento y fecundidad, por la reducción en la calidad nutricional de la hojarasca (David & Handa, 2010). La mortalidad también resulta de la simplificación del hábitat (estructura) y la reducida capacidad de los refugios, como ocurre con muchas prácticas de labranza (Paoletti *et al.*, 2007).

En Argentina se ha considerado una plaga emergente en sistemas agrícolas con siembra directa, puesto que este tipo de prácticas garantizan condiciones de humedad y protección por la cobertura vegetal (rastrojo), favoreciendo su desarrollo y reproducción (Fabero *et al.*, 2011). Esto se debe a que la ausencia de labranza evita la eliminación directa de los individuos y la destrucción del hábitat en las capas superficiales; además, la cobertura de materia seca genera un ambiente que permanece húmedo, con baja amplitud térmica y que proporciona alimento y refugio (Wolters & Ekschmitt, 1997). Las poblaciones de *A. vulgare* han aumentado en las etapas iniciales de girasol, soja y colza bajo siembra directa en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos (Fabero *et al.*, 2011; Villarino *et al.*, 2012; Salvio *et al.*, 2014), afectando los semilleros en situaciones donde no hay disponibilidad u otra fuente de alimentación (Paoletti & Hassall, 1999).

1.4 Propiedades físicas y químicas del suelo

Las propiedades físicas y químicas de los suelos se han usado tradicionalmente para diagnosticar la calidad y salud de los agroecosistemas. Algunas de las propiedades más estudiadas han sido el contenido de materia orgánica y la densidad aparente.

La materia orgánica (MO) está constituida por los compuestos de origen biológico que se encuentran en el suelo. De acuerdo con la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo, la MO del suelo se define como “la fracción orgánica del suelo que incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición, tejidos y células de organismos que viven en el suelo y sustancias producidas por los habitantes del suelo”. El contenido de MO en el suelo ha sido el indicador químico relacionado con la productividad, pues interviene en el suministro de elementos nutritivos por la mineralización, en particular, la liberación de nitrógeno, fósforo, azufre y micronutrientes disponibles para las plantas; modifica la acidez del suelo por su capacidad amortiguadora; y regula en la capacidad de intercambio catiónico y aniónico. Además, la materia orgánica también afecta la estructura del suelo al favorecer la formación de agregados; mejora la infiltración y distribución del agua en el perfil del suelo y reduce la pérdida de agua por evaporación (Galantini & Suñer, 2008).

Por su parte, la densidad aparente del suelo (DA) se define como la masa de suelo seco en una determinada unidad de volumen edáfico (sólidos + poros) y su valor se relaciona con la proporción de poros existente en dicho volumen de suelo (Blake & Hartge, 1986). Las alteraciones de la DA a través del tiempo pueden ser debidas al laboreo, al tránsito de implementos, al pisoteo animal, al crecimiento de las raíces y/o al movimiento de la fauna en su interior. Debido a la facilidad con la cual se puede medir esta propiedad, se ha utilizado para estimar el grado de deterioro del suelo, teniendo en cuenta que a medida que aumenta su valor, se está produciendo una degradación de la estructura del mismo, bien sea por compactación o por pérdida de materia orgánica (Gal *et al.*, 2007). Aumentos en la DA se asocian también con ambientes edáficos más pobres para el crecimiento de las raíces, debido a la reducción de la aireación y el aumento de la resistencia a la penetración, y a la alteración en las funciones hidrológicas como la infiltración y la percolación (Agostini *et al.*, 2014).

En este trabajo, las propiedades físicas y químicas del suelo se evaluaron de manera complementaria para explicar aquellos cambios en las comunidades de macro y microartrópodos, que pudieran estar relacionados con las modificaciones en estas propiedades producidas por el uso y manejo del suelo. Es importante aclarar que en algunos casos la evaluación de la relación fue insuficiente, dado que las comunidades de fauna del suelo responden a un conjunto más amplio de factores.

1.5 Diversidad y estructura genética en comunidades edáficas

La estructura genética poblacional es la distribución de genotipos en el espacio y en el tiempo, y está determinada por procesos evolutivos históricos que involucran el flujo génico, la deriva genética y la selección (Slatkin, 1987). Los procesos evolutivos en curso, también pueden ser afectados por eventos más recientes como lo pueden ser las perturbaciones ambientales, entre las cuales están los cambios en el uso del suelo y la contaminación del suelo por uso de agroquímicos. Los efectos de las perturbaciones ambientales sobre la estructura genética poblacional dependen de la forma en que los procesos evolutivos se afectan. Por ejemplo, la diferenciación genética entre dos poblaciones – una sometida a un régimen de perturbación del ambiente (estresada) y la otra no – puede ocurrir debido a la selección de un carácter particular y/o debido a la deriva genética aumentada, cuando el estresor ambiental conduzca al decrecimiento del tamaño poblacional (Costa *et al.*, 2013). Se puede sugerir entonces que a nivel poblacional, la fragmentación de hábitats podría resultar en la disminución en los niveles de flujo génico y que la reducción del tamaño poblacional abre el camino hacia un nivel mayor de endogamia y aumenta la importancia de la deriva genética (Hartl & Clark, 2007).

Cuando las poblaciones son pequeñas son más propensas a la extinción, ya que los factores estocásticos (tanto genéticos como demográficos, ambientales y catástrofes) aceleran su decline y las llevan a los llamados vórtices de extinción (Frankham *et al.*, 2002). Éstos se inician cuando las poblaciones son pequeñas, demográficamente inestables y tienen niveles altos de endogamia; la disminución poblacional reduce la adecuación y se produce una retroalimentación positiva, lo que refuerza el decline, aumenta la depresión por endogamia y la susceptibilidad a eventos estocásticos reduciendo aún más el tamaño poblacional, y así sucesivamente hasta llegar a la extinción (Eguiarte *et al.*, 2007; Figura 1).

Otro problema que se ha descrito es el llamado colapso mutacional (o mutational meltdown). Lynch *et al.* (1995) observaron que las mutaciones deletéreas se acumulan más en poblaciones pequeñas, ya que la selección natural es menos eficiente. Cuando las poblaciones son grandes las mutaciones deletéreas son removidas por la selección natural, eliminando la carga genética poblacional. Si la población comienza a declinar, la eliminación de las mutaciones deletéreas disminuye, la purga se vuelve cada vez menos eficiente,

aumenta la carga genética de la población y la adecuación disminuye. El resultado es una retroalimentación positiva similar al vórtice de extinción (Eguiarte *et al.*, 2007).

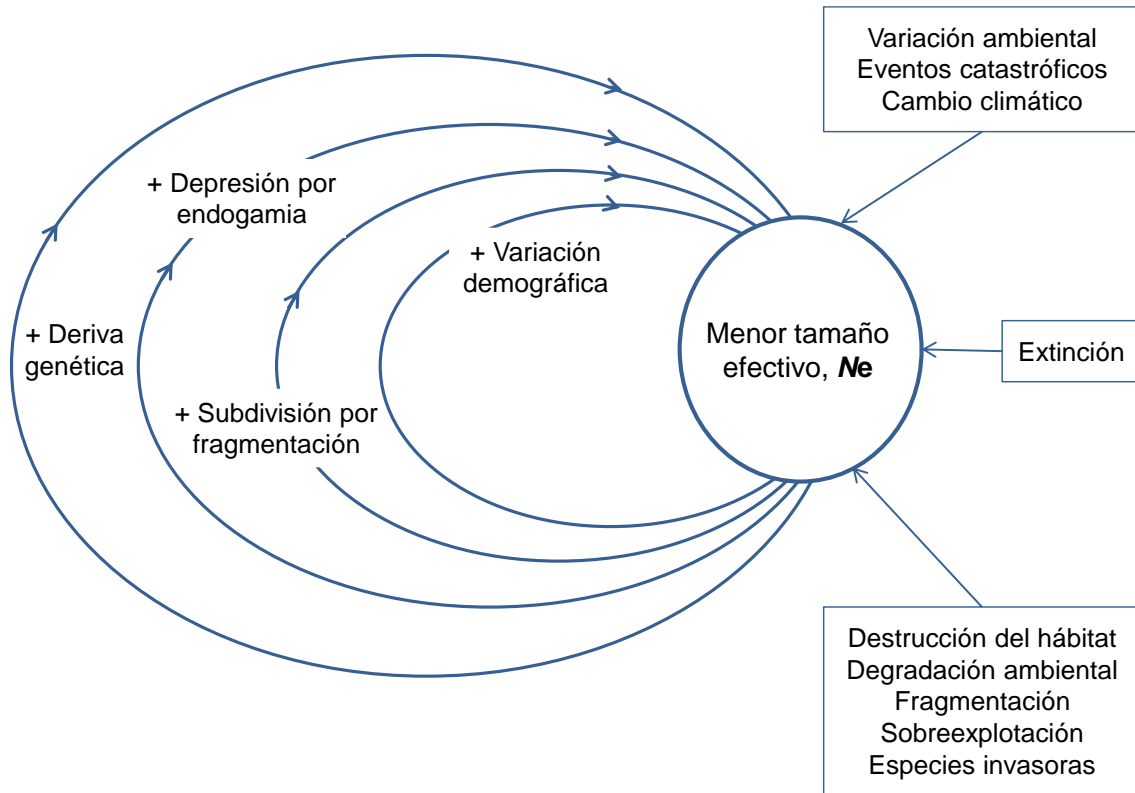


Figura 1. Vórtice de extinción; cuando una población es muy pequeña, los fenómenos estocásticos incrementan el efecto de los problemas genéticos. Redibujado de Eguiarte *et al.* (2007).

Los cuellos de botella, por otra parte, son reducciones drásticas en los tamaños efectivos y pueden repercutir en los niveles de variación genética. Si las poblaciones permanecen pequeñas por largos periodos de tiempo, el efecto de error de muestreo es acumulativo. Esto genera cambios al azar en las frecuencias alélicas, lo que se conoce como deriva genética (Hartl & Clark, 1997). Debido a que en poblaciones de mayor tamaño las fluctuaciones no son tan grandes, se espera que mantengan niveles de variación genética mayores que en las poblaciones pequeñas.

Para estimar la diversidad y la estructura genética, se pueden amplificar mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) diferentes regiones del genoma y hacer comparaciones entre individuos, poblaciones o especies diferentes (Lowe *et al.*, 2004). En

especies para las que no se cuenta con suficientes datos genómicos previamente publicados, se pueden emplear marcadores moleculares inespecíficos como los ISSRs, Inter-Simple Sequence Repeats o regiones intermedias entre secuencias simples (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2005). Estos marcadores dominantes usan iniciadores (también llamados oligonucleótidos o *primers*) que amplifican al azar diferentes regiones en el genoma y generan un patrón de productos de PCR o huella genética (Wolfe & Liston, 1998) que se visualizan mediante electroforesis en geles de agarosa o acrilamida. El polimorfismo revelado por estos marcadores genéticos provee la resolución apropiada para estudiar la estructura poblacional.

Desafortunadamente no está claro aún cómo los factores ambientales afectan las frecuencias alélicas en *A. vulgare* (Homor *et al.*, 2003), como ha sido más estudiado en otros organismos edáficos como las lombrices de tierra. Por ejemplo, Peles *et al.* (2003) encontraron que la exposición de lombrices a suelos con metales pesados incrementaron el porcentaje de heterocigosis y modificaron las frecuencias alélicas y genotípicas. A su vez Kautenburger (2006), observó que los métodos de labranza (convencional o reducida) impactaron en la estructura genética de las lombrices; asimismo Xiao *et al.* (2006) revelaron que elevadas concentraciones de herbicidas incrementaron el daño en el ADN de *Lumbricus rubellus*. Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que los agroquímicos y otras perturbaciones pueden afectar todos los niveles de la diversidad biológica, la variabilidad genética de las poblaciones de *A. vulgare*, se podría utilizar como un indicador del grado de deterioro de los agroecosistemas, teniendo en cuenta que sus individuos son sensibles a la labranza, a los cambios en la hojarasca, a la aplicación de plaguicidas y otros contaminantes, incrementando las tasas de mortalidad, pérdidas de biomasa y disminución de las tasas de reproducción y crecimiento (Paoletti & Hassall, 1999).

En Argentina se dispone de escasos datos sobre cómo las diferentes prácticas agrícolas afectan a la variabilidad genética de la fauna del suelo. En otras partes del mundo se han estudiado efectos similares en otros grupos de invertebrados como Hemiptera, Diptera (Abbot, 2001), lombrices de tierra (Enckell *et al.*, 1986; Peles *et al.*, 2003; Kautenburger, 2006; Xiao *et al.*, 2006) y Lepidoptera (Roux *et al.*, 2007), entre otros. Es por esto que se hace necesario evaluar cómo las diferentes prácticas agrícolas que son utilizadas en la región Pampeana Argentina están afectando la variabilidad genética de las especies, a la macro y mesofauna que conviven con ella y a las propiedades físicas y químicas del suelo.

Tomando en cuenta los antecedentes nombrados anteriormente, se propuso como **HIPÓTESIS GENERAL** del trabajo que los agroquímicos utilizados para la producción agropecuaria intensiva producirán un efecto de cuello de botella en las poblaciones de *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea), por lo tanto su variabilidad genética será menor en aquellos campos con uso agrícola intensivo con respecto a los campos ganaderos o de pastizal naturalizado.

Para corroborar la hipótesis propuesta, se planteó como **OBJETIVO GENERAL** de la tesis:

Evaluar el efecto de distintos usos del suelo sobre la variabilidad genética de poblaciones de *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea), y sobre las comunidades de macro y microartrópodos edáficos.

Se plantearon los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

- Determinar la variabilidad genética intraespecífica en poblaciones de *Armadillidium vulgare* en diferentes usos del suelo.
- Determinar la relación existente entre el grado de variación genética y la modalidad e intensidad del uso de la tierra.
- Relacionar y comparar los cambios en la variabilidad genética de la población bajo estudio con atributos estructurales (riqueza y densidad) de las comunidades de macro y microartrópodos del suelo.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Área de Estudio

El trabajo se realizó en Luján, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Figura 2). El clima de la región es húmedo mesotermal, con muy poco déficit de agua. La precipitación media anual es de 950 mm, la temperatura media estival es de 25°C y la media invernal de 9.5°C (Blasi *et al.*, 2010). En la Figura 3 se presentan los datos de precipitación y temperatura mensual durante el período de estudio, registrados por la estación meteorológica “INTA Castelar” (Servicio Meteorológico Nacional, 2009–2013). Fitogeográficamente, Luján se ubica en la región Neotropical, dominio Chaqueño, distrito Oriental de la provincia Pampeana y la vegetación dominante es la estepa o pseudoestepa de gramíneas (Orgeira *et al.*, 2009). Los sitios de estudio se encuentran ubicados en la cuenca media del río Luján, de vertiente al sistema Gran Cuenca del Plata. La misma se encuentra en la subregión geomorfológica de la Pampa Ondulada, subzona I según Scoppa & Vargas Gil (1969).

Los suelos muestreados se encuentran localizados en un ambiente de planicie loésica. En los suelos estudiados, el material originario o parental es un loess limo–arenoso de coloraciones rojizas, de edad Pleistoceno Superior, asignado a la Formación Buenos Aires. Ésta corresponde a la parte superior del conocido “loess pampeano”. Los procesos pedogenéticos dominantes han sido la melanización y la argiluviación. Son necesarios tiempos comprendidos entre 1 ka y 10 ka para la formación de un horizonte Bt, lo que implica para la región la existencia de un régimen endopercolativo y un excedente hídrico anual por largos períodos de tiempo, necesarios para producir la argiluviación (Orgeira *et al.*, 2009). La carta de suelos de la provincia de Buenos Aires, describe la unidad cartográfica a la que pertenece el sitio de estudio como un suelo formado por una asociación de tres series: Mercedes 13, Portela y Gowland con una composición de Argiudol típico (60 %), Natracualf (10 %) y Argialbol (30 %). Los suelos representativos pertenecen al orden de los Molisoles, gran grupo Argiudoles, subgrupo Típicos (Duhour *et al.*, 2009).

El trabajo se realizó en dos campos; el campo experimental de la Universidad Nacional de Luján (34°35' S; 59°04' W) y un predio rural privado (Etchegoyen, en la localidad de Open Door, 34°26' S; 59°04' W; Figura 2).

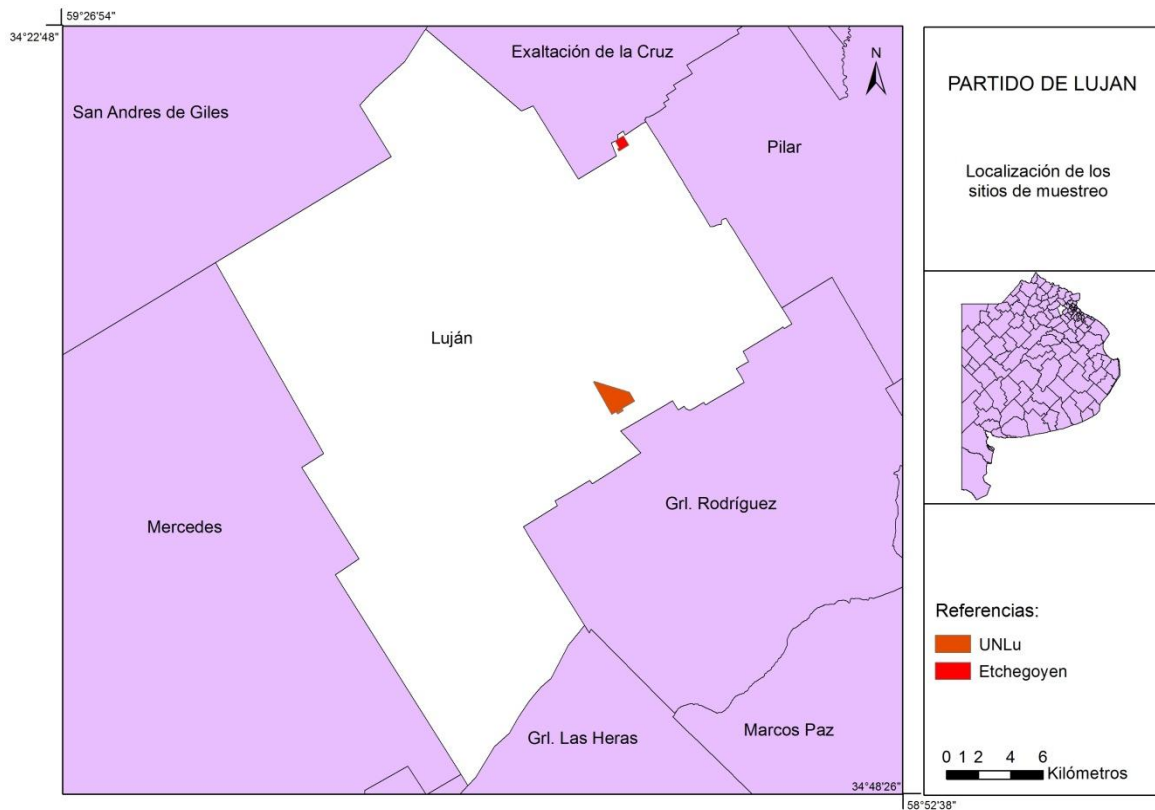


Figura 2. Localización geográfica del Partido de Luján y de los sitios de estudio, UNLu y Etchegoyen, en la Provincia de Buenos Aires, Argentina.

El campo experimental de la Universidad Nacional de Luján (Figura 4) tiene una superficie en explotación de 164.8 hectáreas. La principal actividad productiva es la cría de ganado vacuno para producción lechera (*Bos taurus*, raza Holando Argentino). De acuerdo con el mapa básico (Sfeir *et al.*, 1989), los suelos del predio corresponden a Argiudoles típicos, que se organizan en el paisaje formando diferentes complejos. El paisaje presente es heredado de un clima anterior al actual, más húmedo, lo que permitió definir las geoformas que sólo fueron parcialmente modificadas hasta el presente, y como consecuencia, el sitio presenta pequeñas porciones de lomas que dominan las partes altas del relieve alternando con líneas de vaguada. Hay predominio de áreas con pendiente escasa, casi planas y áreas con pendiente mayor, lo que define un ambiente favorable para el desarrollo de suelos con leves a moderados síntomas de hidromorfismo y problemas de drenaje interno (pseudogley en áreas altas y planas), y suelos con distinto grado de erosión hídrica en las áreas de mayor pendiente. En las líneas de vaguada y sus cercanías, los suelos pueden presentar problemas de drenaje interno, napa freática cercana a la superficie o en superficie y sedimentación.

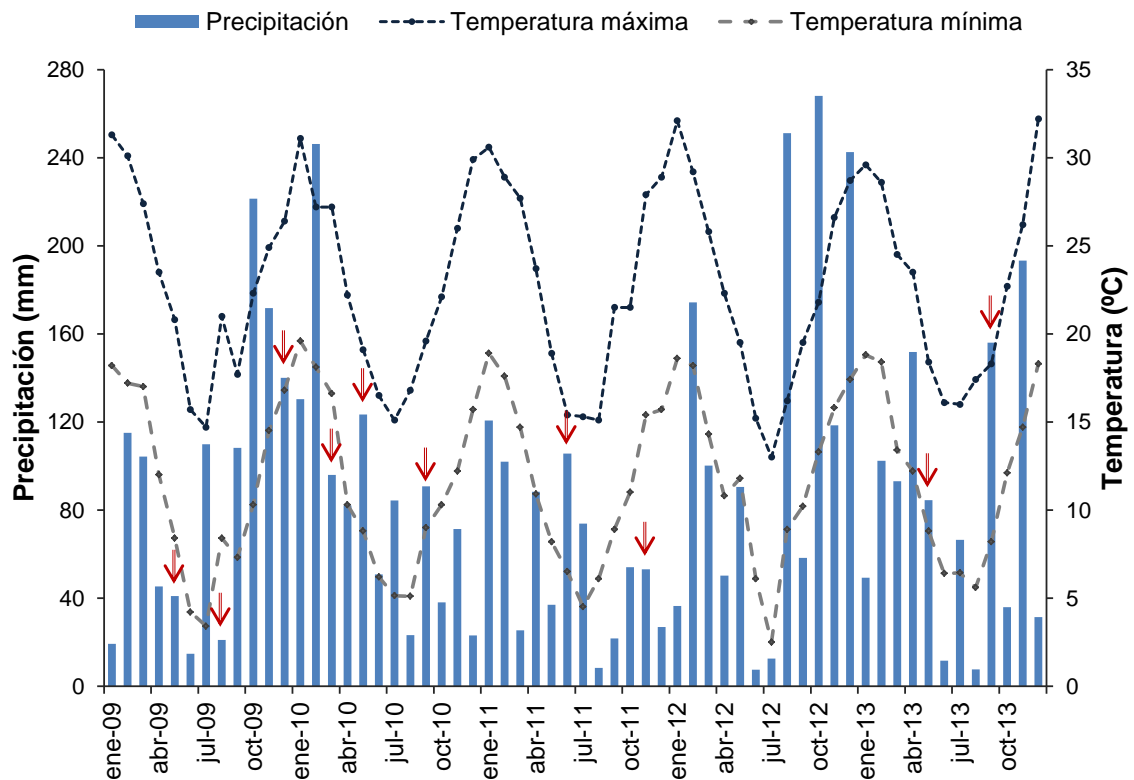


Figura 3. Precipitación mensual (mm) y temperaturas máxima y mínima (°C) para el área de estudio durante el período 2009–2013. Las flechas indican la realización de cada muestreo.

El mapa básico de suelos de la Universidad Nacional de Luján presenta dos series de suelos (Sfeir *et al.*, 1989; Momo *et al.*, 1993). La Serie 1 se ubica en las zonas más altas del campo (31 m.s.n.m.) y corresponde al sitio donde se asienta el tambo. El resto del campo presenta distintos complejos de la Serie 2 y sus fases. La Serie 2 ocupa posiciones positivas, lomas planas extendidas donde se asocia con microdepresiones que poseen síntomas de hidromorfismo marcado en la zona de contacto entre los horizontes A y B, y medias lomas altas. A continuación se presenta la descripción morfológica del perfil representativo y las características físicas, físico-químicas y químicas del suelo de la Serie 2 (Tabla 1):

Ap1 0–12 cm; pardo grisáceo oscuro (10 YR 4.5/2) en seco y gris muy oscuro (10 YR 3/2) en húmedo; textura franco limosa; estructura en bloques subangulares finos, débiles a moderados; blando en seco, muy friable en húmedo; plástico y ligeramente adhesivo; raíces muy abundantes; límite inferior claro y suave.



Figura 4. Localización de los lotes de muestreo en el campo experimental de la Universidad Nacional de Luján. AU: Agrícola UNLu; GU: Ganadero UNLu; NU: Pastizal Naturalizado UNLu.

- Ap2 12–21 cm; pardo grisáceo oscuro (10 YR 4/2.5) en seco y gris muy oscuro (10 YR 3/2) en húmedo; textura franco limosa; estructura en bloques aplanados, angulares, gruesos y fuertes a moderados; muy duro a duro en seco, densificado por laboreo; muy firme en húmedo; plástico y ligeramente adhesivo; raíces abundantes; límite inferior claro y suave.
- A1 21–36 cm; pardo grisáceo oscuro (10 YR 4.5/2) en seco y pardo muy oscuro (10 YR 3/2.5) en húmedo; textura franco limosa; estructura en bloques subangulares gruesos moderados; ligeramente duro a blando en seco, friable en húmedo; plástico, ligeramente adhesivo; moteados precisos, comunes y finos; raíces abundantes a comunes; límite inferior abrupto y suave.
- Bt1 36–63 cm; pardo a pardo oscuro (7.5 YR 4/4) en seco y pardo oscuro (7.5 YR 3/4) en húmedo; textura arcillosa; estructura en prismas compuestos regulares que rompen

a bloques angulares medios, moderados a fuertes; muy duro a duro en seco, muy firme en húmedo; muy plástico, muy adhesivo; barnices húmico-arcillosos muy abundantes, raíces comunes; límite inferior claro y suave a ondulado.

Bt2 63–83 cm; pardo (7.5 YR 5/4) en seco y pardo oscuro (7.5 YR 4/4) en húmedo; textura arcillosa; estructura en prismas compuestos regulares muy gruesos, fuerte a moderados que rompen a bloques angulares regulares medios, moderados a fuertes; muy duro a duro en seco y muy firme a firme en húmedo; muy plástico y adhesivo; barnices húmico-arcillosos abundantes, raíces comunes; límite inferior claro a gradual y ondulado.

BC1 83–120 cm; pardo a pardo claro (7.5 YR 5.5/4) en seco y pardo a pardo oscuro (7.5 YR 4/4) en húmedo; textura arcillo limosa; estructura en bloques angulares gruesos a medios, moderados; ligeramente duro en seco, firme en húmedo; plástico y ligeramente adhesivo; barnices húmico-arcillosos abundantes, moteados precisos, comunes y finos; raíces comunes; límite inferior gradual y ondulado.

BC2 +120 cm; pardo claro (7.5 YR 6/4) en seco y pardo a pardo oscuro (7.5 YR 4/3) en húmedo; textura franco arcillo limosa; estructura en bloques medios débiles; ligeramente duro a blando en seco, friable en húmedo; plástico, ligeramente adhesivo; barnices húmico-arcillosos escasos; moteados precisos, abundantes y finos; raíces comunes; límite inferior gradual y suave.

Tabla 1. Características físicas, físico-químicas y químicas de los horizontes de suelo de la Serie 2, presente en el área de estudio.

Horizonte	Ap1	Ap2	A12	Bt1	Bt2	BC1	BC2
Profundidad (cm)	0-12	12-21	21-36	36-63	63-83	83-120	+120
Materia orgánica (%)	3.65	3.39	2.37				
Arcilla (%)	27.3	31.0	33.0	53.1	50.9	36.8	39.0
Limo (%)	59.1	56.9	56.6	38.6	30.5	52.3	51.1
Arena (%)	13.6	12.1	10.4	8.3	18.6	10.9	9.9
Textura	F-L	F-L	a-L	a	a	F-a-L	F-a-L
pH (agua 1:2.5)	5.6	5.6	5.6	5.4	5.8	6.2	6.3

F: Franco; L: Limo; a: arcilla. Fuente: Sfeir *et al.* (1989), Momo *et al.* (1993).

De acuerdo con la descripción morfológica y con los datos analíticos de los horizontes, el suelo se clasificó como Argiudol típico que presenta rasgos de hidromorfismo en la interfase entre los horizontes A y B.

El predio rural privado Etchegoyen (Figura 5) tiene una superficie de explotación de 41.7 hectáreas y la principal actividad productiva es el cultivo de soja. Los suelos del predio se desarrollaron en lomas y suaves pendientes sobre limos loésicos, en los cuales el incremento de arcilla es gradual desde la superficie hasta alcanzar un máximo en el horizonte argílico. Son suelos profundos, moderadamente bien drenados, con horizonte superficial (A) bien provisto de MO (mayor de 3%), color muy oscuro, franco limosos y estructura en bloques subangulares a granular; y horizonte subsuperficial (B) franco arcilloso (contenido de arcilla mayor de 35%) y de estructura prismática con abundantes barnices de arcilla iluvial (Damiano & Taboada, 2000). Los suelos del predio se clasificaron como Argiudoles típicos.

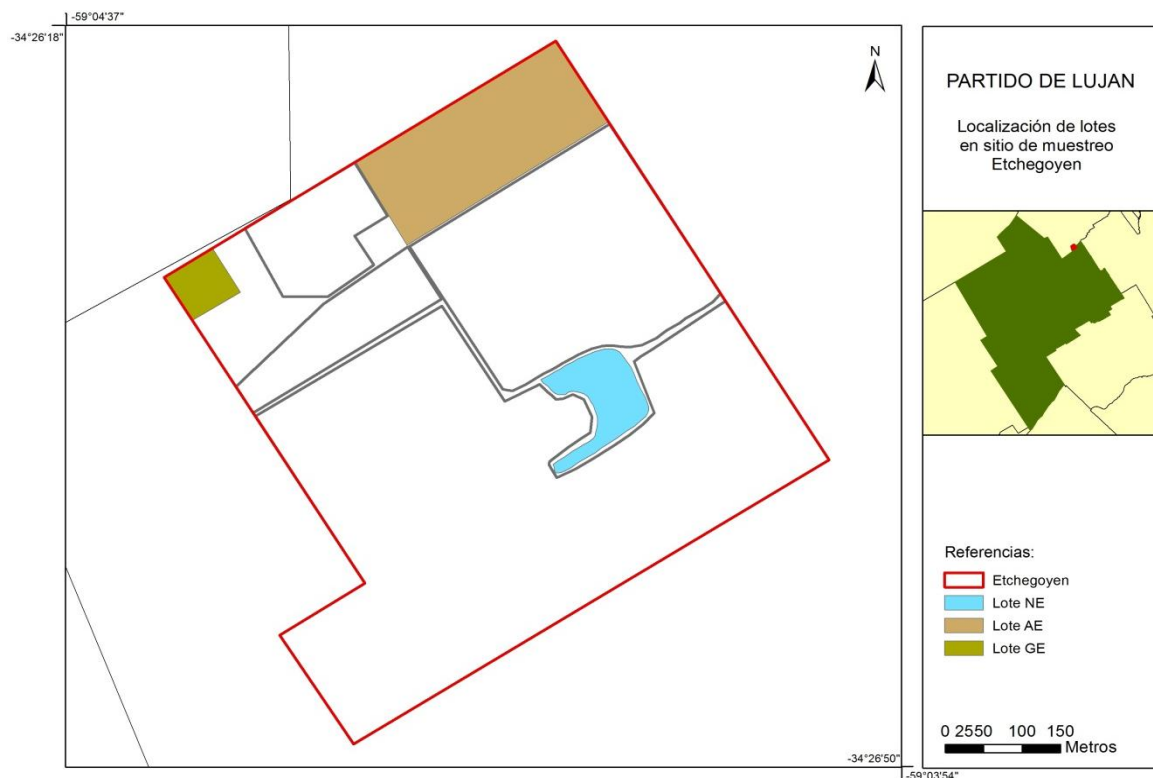


Figura 5. Localización de los lotes de muestreo en el predio rural privado Etchegoyen. NE: Pastizal Naturalizado Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen.

En cada campo se eligieron tres lotes de 9 hectáreas aproximadamente, con usos diferentes: agricultura convencional, con cultivos anuales de soja (*Glycine max*), maíz (*Zea mays* L.) y trigo (*Triticum spp.*); ganadería con pastoreo intensivo; y pastizal naturalizado (Figuras 4 y 5). Estos últimos fueron tomados como sistemas de referencia, porque en ellos no se realizaron prácticas agropecuarias en los últimos 30 años. En el campo experimental de la Universidad Nacional se registra actividad agrícola desde el año 1984. En el lote con uso ganadero de la UNLu se hace pastoreo desde 1987 y en el último período del estudio se sembró maíz. En Etchegoyen, se tienen registros de actividad en el lote agrícola desde 1998. El lote con ganadería no registró actividad agrícola intensiva, salvo en 2001 cuando se sembró maíz. En este lote, la carga animal es de 78 cabezas/ha.

Para los usos ganaderos y agrícolas de UNLu y Etchegoyen, se detalla la historia de uso durante el período 2008–2014 (Tabla 2) y se resumen brevemente las labores e insumos utilizados en los períodos de muestreo (Tabla 3).

Tabla 2. Rotación de cultivos en el período 2008–2014 para los usos ganadero (G) y agrícola (A) en UNLu y Etchegoyen.

Período	UNLu		Etchegoyen	
	GU	AU	GE	AE
2008/09	PP	Maíz/Soja	PP	Trigo/Soja
2009/10	PP	Soja	PP	Maíz
2010/11	PP/Raigrás	Soja/Sorgo	PP	Soja
2011/12	Raigrás	Maíz	PP	Maíz
2012/13	Raigrás/Maíz	Maíz/Avena	PP	Soja
2013/14	Maíz	PP	PP	Soja

PP: Pastura Permanente. Alfalfa Monarca (*Medicago sativa*), Trébol rojo (*Trifolium pratense* L), Pasto Ovillo (*Dactylis glomerata* L), Porto, Cebadilla Ferro Plus (*Bromus unioloides*), Festuca Palenque (*Festuca pallescens*).

Tabla 3. Labores e insumos aplicados en los suelos con uso ganadero (G) y agrícola (A) en UNLu y Etchegoyen en los períodos de muestreo.

Sitio	Ciclo	Fertilización	Herbicidas	Labranza	Pastoreo
GU	2009/10	DAP (130 kg/ha)	--	--	BOVINOS
	2010/11	Urea (135 kg/ha)	Preside (Flumetsulam) (0.2 l/ha) 2,4-DB (0.6 l/ha)	Disco	BOVINOS
	2011/12	--	--	--	BOVINOS
	2012/13	SPT (100 kg/ha)	Atrazina (3 l/ha) Acetoclor (3 l/ha)	Cinzel Disco	BOVINOS
GE	2009/10			--	OVINOS
	2010/11			--	OVINOS
	2011/12			--	OVINOS
	2012/13			--	OVINOS
AU	2009/10	Urea (200 kg/ha)	Glifosato (5 l/ha)	Arado Disco	--
	2010/11	Urea (100 kg/ha)	Glifosato (5 l/ha)	Disco	--
	2011/12	SPT (100 kg/ha)	Glifosato (4 l/ha) Atrazina (4 l/ha)	Disco Rabasto	--
	2012/13	Urea (100 kg/ha) SPT (120 kg/ha)	Preside (Flumetsulam) (0.5 l/ha) 2,4-DB (0.4 l/ha)	--	--
AE	2009/10	DAP (50 kg/ha) Urea (100 kg/ha)	Glifosato (1.5 l/ha) 2,4 D (0.5 l/ha)	--	--
	2010/11	SPT (40 kg/ha) SSP (40 kg/ha)	Glifosato (3 l/ha) 2,4 D (0.6 l/ha)	Descomp	--
	2011/12	MAP/Urea (80 kg/ha) Sol MIX (100 l/ha)	Glifosato (1.5 l/ha) Atrazina (5 l/ha)	--	--
	2012/13	Mezcla sojera	Glifosato (3 l/ha)	Disco rastra	--

SPT: Superfosfato triple (N: 0, P: 46, K: 0); SSP: Superfosfato simple (N: 0, P: 20, K: 0, S:12); DAP: Fosfato diamónico (N: 18, P: 46, K: 0, S: 0); MAP: Fosfato monoamónico (N: 10, P: 50, K: 0, S: 0); Sol MIX 90/10 (N: 30, P: 0, K: 0, S: 2.6); Mezcla sojera (N: 6.6, P: 39.6, K: 0, S: 4.8).

2.2 Muestreos y mediciones de campo

Se realizaron diez muestreos estacionales para la caracterización de los macro y microartrópodos y de las propiedades físicas y químicas del suelo. Los muestreos se realizaron en mayo, agosto y diciembre de 2009, marzo, mayo y septiembre de 2010, junio y noviembre de 2011, mayo y septiembre de 2013 (Figura 3).

En cada lote se definió una transecta de 30 m en sentido perpendicular al borde de acceso y sobre esa transecta se ubicaron tres puntos cada diez metros. La toma de varias muestras distantes entre sí, se pueden considerar estadísticamente independientes (es decir, que no presentan pseudorreplicación) ya que, como está ampliamente demostrado en el caso de estos suelos, las distancias entre muestras exceden ampliamente las distancias de autocorrelación, con lo cual los datos son estadísticamente independientes aunque estén tomados en el mismo campo (Conti *et al.*, 1980; Giuffré *et al.*, 1998; M. Massobrio, *comunicación personal*).

2.3 Análisis de la variabilidad genética de *Armadillidium vulgare*

2.3.1 Muestreo de *A. vulgare*

En cada lote y para cada fecha de muestreo, se colectaron manualmente los isópodos de la hojarasca y se mantuvieron vivos en el laboratorio hasta su identificación y posterior extracción de ADN. Los individuos de *A. vulgare* se identificaron usando las claves de Dindal (1990) y Araujo *et al.* (1996).

2.3.2 Extracción de ADN

Se empleó el protocolo descrito por von der Schulenburg *et al.* (2001) con algunas modificaciones, usando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para aislar el ADN genómico total. La extracción de ADN se realizó de tejidos blandos obtenidos de ejemplares recién sacrificados para evitar efectos debidos a la fijación, con excepción del tracto digestivo, de acuerdo con Homor *et al.* (2003) y Verne (2006). Se realizó la extracción de ADN de 372 individuos de *A. vulgare*, pero sólo 215 de ellos amplificaron y se analizaron a nivel molecular.

Se introdujeron 0.05 g de tejido de cada individuo en un tubo estéril de 2 ml. Se adicionaron 700 µl de buffer CTAB (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA y 1.4 M NaCl) calentado previamente a 65°C y 20 µl de Proteínasa K (20 mg/ml). Cada tubo se agitó en vórtex durante dos minutos y se incubaron a 65°C durante toda la noche. Luego se le agregaron 400 µl de solución cloroformo: isoamilalcohol (24:1, v/v) y se mezclaron durante un minuto en vórtex para homogeneizar las fases acuosa y orgánica. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 12000 rpm y el sobrenadante (600 µl aprox.) se transfirió a un nuevo tubo estéril de 2 ml. Se adicionaron 600 µl de isopropanol (2-propanol) y 300 µl de acetato de amonio 5 M, se mezclaron por inversión para permitir la precipitación del ADN y se centrifugaron a 10000 rpm por diez minutos. Se descartó el sobrenadante, se invirtieron los tubos sobre papel absorbente y se dejaron secar al aire por cinco minutos. Los pellets se lavaron con 500 µl de etanol frío (-20°C) al 70% (v/v), se descartó el etanol y se

centrifugaron nuevamente a 10000 rpm durante cinco minutos. Los tubos se invirtieron sobre papel absorbente y se dejaron secar al aire. Los pellets se resuspendieron en 100 µl de buffer TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM EDTA; Sambrook & Russel, 2001) y se almacenaron a -20° C.

La cuantificación del ADN genómico se determinó por comparación visual con marcadores de peso molecular de 1 kb y 100 pb después de la electroforesis en geles de agarosa al 1% usando buffer TBE 1X (Tris base, ácido bórico y EDTA 0.5 M pH 8.0; Sambrook & Russel, 2001), teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen) y/o GelRed™ y visualizados mediante transiluminador de UV.

2.3.3 ISSR-PCR y electroforesis

Para el análisis de la variabilidad genética de *A. vulgare* se usaron marcadores genéticos neutrales ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat o regiones intermedias entre secuencias simples repetidas). Los ISSRs permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en el genoma, particularmente el nuclear y que probablemente son secuencias de ADN no codificantes. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT)_n o (CA)_n, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2005). Ver Apéndice 1.

Se probaron doce *primers* (Tabla 4), pero los análisis se realizaron con los cuatro cebadores más informativos (en negrita), que mostraron bandas claramente reproducibles y que generaron un mínimo de 60 *loci* polimórficos, de acuerdo con lo recomendado por Nelson & Anderson (2013) y Benevides *et al.* (2014).

Las amplificaciones se realizaron usando un volumen final de 20 µl que contenían 5 µl de ADN templado diluido (1:5), 1X Buffer para PCR sin Mg, 1.75 mM de MgCl₂, 0.25 mM de cada dNTP (Invitrogen®), 3 µM de cebador, 1.5 U de *Taq* ADN polimerasa (TAQ Pegasus, PB-L®) y agua estéril Millipore. Las muestras se incubaron en tubos de 0.2 ml en termociclador (Mastercycler personal Eppendorf®), que fue programado para la desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C,

45 segundos a la temperatura de alineación específica para cada *primer* (Tabla 4) y 2 minutos a 72°C, y el último paso de extensión a 72°C por 10 minutos. Un control negativo (sin ADN templado) se incluyó en cada corrida para descartar una posible contaminación de la PCR. Cada individuo se amplificó por lo menos dos veces para verificar la reproducibilidad de cada banda seleccionada.

Tabla 4. *Primers* ISSR y temperaturas de alineación usadas en la PCR.

<i>Primer</i>	Secuencia 5' – 3'	Abreviación	Temperatura de alineación (°C)
ISSR 1	CACACACACACAAC	(CA) ₇ AC	44
ISSR 2	CACACACACACAGT	(CA) ₇ GT	46
ISSR 3	CACACACACACAAG	(CA) ₇ AG	44
ISSR 4	CACACACACACAGG	(CA) ₇ GG	47
ISSR 5	GTGGTGGTGGTGGTGGC	(GTG) ₅ GC	56
ISSR 6	CTCTCTCTCTCTCTTG	(CT) ₈ TG	44
ISSR 7	ACACACACACACACG	(AC) ₈ G	53
ISSR 8	AGAGAGAGAGAGAGT	(AG) ₈ T	51
ISSR 9	GAGAGAGAGAGAGAC	(GA) ₈ C	53
ISSR 10	GTGTGTGTGTGTGTRT	(GT) ₇ RT	49
ISSR 14	CTCTCTCTCTCTCTAC	(CT) ₈ AC	54
ISSR 15	CTCTCTCTCTCTCTGC	(CT) ₈ GC	57

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa de 1.5%, teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen) o GelRed™, corridos a 90 V por 1.5 horas en buffer TBE 1X (Tris base, ácido bórico y EDTA 0.5 M pH 8.0; Sambrook & Russel, 2001), visualizados bajo luz UV y fotografiados con cámara digital (ver Apéndice 2, Figuras A2, A3, A4 y A5). Los tamaños de los fragmentos amplificados se estimaron usando cinco microlitros de marcador de peso molecular de 100 pb plus (Dongsheng Biotech®) como referencia para cada gel.

2.4 Comunidad de artrópodos del suelo

2.4.1 Macroartrópodos

En cada lote y para cada fecha de muestreo se extrajeron tres monolitos de 0.25 x 0.25 m y 0.1 m de profundidad (Anderson & Ingram, 1993) y de cada uno de ellos se retiraron manualmente los macroartrópodos presentes. Los ejemplares colectados se conservaron en etanol al 70%. En el laboratorio, se separaron de acuerdo con su morfología y se identificaron hasta el nivel de orden o familia usando las claves de Dindal (1990), Morrone & Coscarón (1998), Peña Guzmán (2006) y Clap *et al.* (2008). Para todos los taxones se separaron los individuos adultos de los estados larvales (inmaduros). Para cada lote se cuantificaron la densidad (número de individuos por metro cuadrado) y el número de grupos taxonómicos.

2.4.2 Microartrópodos

En cada lote y para cada fecha, se tomaron tres muestras de suelo sin disturbar usando cilindros de PVC de 10 cm de diámetro y 10 cm de profundidad. En el laboratorio, los microartrópodos se extrajeron de las muestras por el sistema del embudo de Berlese-Tullgren durante 10 días (Southwood, 1980). Los individuos colectados se conservaron en etanol al 70% y se contaron mediante lupa estereoscópica. Los individuos colectados se identificaron hasta una resolución de orden/suborden o familia, usando las claves de Dindal (1990), Bernava & Palacios-Vargas (2008) y Momo & Falco (2009). Para todos los taxones se separaron los individuos adultos de los juveniles. Se realizaron recuentos determinando la abundancia (número de individuos por metro cuadrado) para cada grupo taxonómico.

2.5 Parámetros físicos y químicos del suelo

En los mismos puntos donde se colectó la fauna, se tomaron muestras en el horizonte A del suelo (primeros diez centímetros) para determinar la densidad aparente (DA), la humedad gravimétrica (Hum, %), el contenido de materia orgánica (MO, %) y el nitrógeno total (Nt, %).

La densidad aparente expresa la relación entre la masa de suelo seco (partículas minerales y materia orgánica) y una determinada unidad de volumen edáfico (sólidos + poros). La DA se determinó por el método del cilindro (Blake & Hartge, 1986), que consistió en la extracción de muestras de suelo no disturbadas usando cilindros metálicos de 7.25 cm de diámetro y 5.8 cm de altura. En el laboratorio se obtuvo el peso húmedo de las muestras, se secaron en estufa a 105 °C por 48 h y se pesaron nuevamente. Posteriormente se realizó el cálculo de la densidad aparente como la relación entre la masa de suelo seco (M_s) de la muestra y el volumen total (V_t) que ocupa la muestra.

$$\delta_a = \frac{M_s}{V_t} = \frac{M_s}{V_s + V_w + V_a}$$

La humedad gravimétrica es la relación entre la masa de agua (M_a) y la masa de suelo seco (M_s). El contenido de agua en el suelo se calculó de las mismas muestras usadas para determinar la DA, secadas a 105° C.

$$W(\%) = \frac{M_a}{M_s} * 100$$

El contenido de materia orgánica se calculó por el método de pérdida de peso por ignición (Gavlak *et al.*, 2003). Este método permite la determinación de la MO total del suelo, incluyendo las formas condensadas, humus, humatos y residuos orgánicos poco alterados (Davies, 1973). Para determinar el contenido de MO se tomó una alícuota de 10 g de suelo seco y tamizado (< 2 mm) en una cápsula de porcelana y se colocó en estufa (a 105 °C) durante 2 h para eliminar la humedad. Luego de pesadas, las muestras se colocaron en mufla a 360 °C durante 2 h y se pasaron nuevamente a la estufa a 105 °C durante 1 h. Antes de determinar el peso, las muestras se colocaron en un desecador, con sílica gel, hasta

alcanzar la temperatura ambiente y para evitar la absorción de humedad. El contenido de materia orgánica, en porcentaje, se calculó de acuerdo con la siguiente relación:

$$LOI(\%) = \frac{\text{Peso inicial}_{(105\text{ }^{\circ}\text{C})} - \text{Peso final}_{(105\text{ }^{\circ}\text{C})}}{\text{Peso inicial}_{(105\text{ }^{\circ}\text{C})} - \text{Peso cápsula}} * 100$$

Con temperaturas de 360 °C se logra la completa oxidación de la MO. Se utilizó carbonato de calcio (CaCO₃) como control para evaluar la pérdida potencial de carbonatos de alcalimetales.

El nitrógeno total se determinó por el método Kjeldahl (Gavlak *et al.*, 2003). Primero, se produce la descomposición del nitrógeno que contienen las muestras utilizando una solución de ácido concentrado. Esto se obtiene haciendo hervir la muestra en una concentración de ácido sulfúrico. El resultado es una solución de sulfato de amonio. Luego se libera amoníaco, el cual es retenido en una solución con una cantidad conocida de ácido bórico. Inicialmente se realiza una destilación con vapor por el método de arrastre de vapor de agua, mediante la cual acelera la obtención del destilado. Al final, se utiliza la titulación para valorar finalmente la cantidad de amonio presente en la muestra destilada.

Los valores de materia orgánica y nitrógeno se usaron para estimar la relación C/N. El contenido de carbono orgánico se calculó a partir del porcentaje de materia orgánica, usando el factor convencional de Van Bemmelen, 1.724 (AOAC, 1975), según la relación:

$$CO (\%) = \frac{MO(\%)}{1.724}$$

El uso de este factor se ha generalizado con la consideración de que la materia orgánica del suelo contiene en promedio 58% de carbono.

2.6 Análisis de la información

2.6.1 Análisis de datos moleculares

Los fragmentos amplificados por individuo se registraron en una matriz binaria basada en la presencia (1) o ausencia (0) de cada banda de peso molecular específico. Sólo se tomaron en cuenta las bandas claramente observadas para cada individuo y para cada cebador.

Para cada *primer* se calculó el número de bandas polimórficas (BP), número de bandas monomórficas (BM) y número de bandas totales (BT), la proporción de *loci* polimórficos [PMF (95)], y se obtuvieron los valores del contenido de información polimórfica (PIC) promedio, el error estándar del PIC (EE), el porcentaje de amplificación (porcentaje de datos iguales a 1) y la probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo (PDICMA), usando el programa InfoGen® versión 2014 (Balzarini & Di Rienzo, 2014). El PIC se calculó usando la fórmula $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$, donde f_i es la frecuencia relativa del alelo amplificado (banda presente) y $(1-f_i)$ es la frecuencia relativa del alelo nulo (banda ausente) del marcador i . La probabilidad de que dos individuos (muestras) compartan el mismo alelo por azar se calculó como $P_i(X_D)^n$, donde X_D representa el índice de similitud promedio para todos los pares de comparaciones, calculado como $X_D = (2N_{AB}) / (N_A + N_B)$, donde N_{AB} representa el número de bandas presentes en ambas muestras, N_A y N_B representan el número total de bandas en las muestras A y B respectivamente, y n representa el número promedio de productos de amplificación por muestra (Balzarini & Di Rienzo, 2003).

Variabilidad genética

Para analizar la variabilidad entre usos dentro de cada sitio se obtuvo el número de bandas, el porcentaje de *loci* polimórficos, el número de alelos (N_a) y número efectivo de alelos (N_e), la diversidad genética (h) y el índice de información de Shannon (I) usando el programa GenAlEx® 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). La proporción de *loci* polimórficos se calculó como el número de *loci* polimórficos/número total de *loci*. La diversidad genética de cada uso se estimó como $h = 1 - (p^2 + q^2)$ y el índice de información de Shannon se calculó como

$I = -1 * [p * \ln(p) + q * \ln(q)]$, donde p = frecuencia de la banda y $q = 1 - p$. Como los datos no tienen distribución normal, los valores de la diversidad genética y del índice de información de Shannon se compararon entre usos para cada sitio usando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (de Aranzamendi *et al.*, 2014).

Distancias genéticas

Para medir las diferencias genéticas entre pares de individuos se calculó el coeficiente de similitud (S) de Nei & Li (1979) y sus correspondientes distancias genéticas ($1 - S$), a partir de la matriz de presencia/ausencia de las bandas. En este coeficiente de similitud no se toman en cuenta las ausencias conjuntas y las concordancias se ponderan doblemente, de acuerdo con la relación:

$$S(i_1, i_2) = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

Donde a corresponde al número de bandas compartidas por los dos individuos (1,1); b es el número de posiciones donde el individuo i_1 tiene una banda, pero i_2 no (1,0); y c corresponde al número de posiciones donde el individuo i_2 tiene una banda, pero i_1 no (0,1) (Kosman & Leonard, 2005). Este procedimiento es favorable en el caso de marcadores dominantes como los ISSRs, porque no es necesario asumir Equilibrio de Hardy-Weinberg (Lowe *et al.*, 2004; Manrique-Poyato *et al.*, 2013). Las distancias genéticas de Nei & Li (1979) entre pares de individuos se calcularon usando el programa InfoGen® (Balzarini & Di Rienzo, 2014).

Para examinar las relaciones entre usos dentro de cada sitio se realizó el análisis exploratorio de Coordenadas Principales (PCo) basado en la matriz de distancia genética de Nei & Li (1979) entre pares de individuos. El análisis de coordenadas principales se utiliza para mostrar las relaciones definidas por distancias o similitudes en un espacio de baja dimensión, tal que las distancias o similitudes en el espacio en el que son calculadas sean preservadas tanto como sea posible (Balzarini & Di Rienzo, 2003). El análisis se realizó con GenAlEx® 6.5. (Peakall & Smouse, 2012).

Para visualizar las relaciones entre individuos, se construyó un árbol NJ (*Neighbor-Joining*) basado en las distancias genéticas de Nei obtenidas con el programa AFLP-Surv® (Vekemans, 2002). Se utilizaron los procedimientos *NEIGHBOR* y *CONSENCE* del paquete Phylip versión 3.66 (Felsenstein, 2004), con 1000 *bootstrap*. Posteriormente, se usó la salida del paquete Phylip para construir árboles sin raíz unidos por NJ con el programa MEGA® versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

Para evaluar la existencia de aislamiento por distancia se utilizó el test de Mantel (Mantel, 1967) entre las matrices de distancia genética y de distancia geográfica, usando 1000 permutaciones con el programa GenAlEx® 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Se utilizaron las distancias genéticas de Nei & Li (1979) estimadas precedentemente, mientras que las distancias geográficas entre pares de usos dentro de cada sitio se obtuvieron usando Google Maps®/Google Earth® (Google Corporation, 2015). Se calculó el coeficiente de determinación (R^2), que indica qué tan bien se ajustan los puntos de los datos a un modelo de regresión lineal. Cuando el coeficiente de correlación entre las dos matrices es positivo ($0 < r < 1$), indica que existe una estructura espacial que podría relacionarse con la distancia geográfica, con barreras o con características del paisaje que impiden o reducen el flujo génico (Guillot *et al.*, 2009).

Diferenciación y estructura genética

La diferenciación genética entre pares de usos dentro de cada sitio se calculó de dos maneras. Primero, se estimaron las frecuencias alélicas por implementación del método bayesiano de Zhivotovsky (1999), asumiendo que las subpoblaciones están en Equilibrio de Hardy-Weinberg. A partir de estas frecuencias alélicas, se calculó el estimador F_{ST} de Wright (1946) usando el procedimiento de Lynch & Milligan (1994) para marcadores dominantes, con el programa AFLP-Surv® (Vekemans, 2002). Estos valores se estimaron basados en 1000 permutaciones aleatorias. La significancia de los valores de F_{ST} se obtuvieron usando la fórmula $\chi^2 = 2N F_{ST}(k - 1)$, con grados de libertad igual a $(k - 1)$, donde N corresponde al número de individuos y k es el número de subpoblaciones (usos) dentro de cada sitio (Workman & Niswander, 1970; de Aranzamendi *et al.*, 2008).

En la segunda estimación, se calculó el índice Φ_{PT} (Excoffier *et al.*, 1992), análogo al F_{ST} de Wright, a partir de la matriz de distancias genéticas binarias entre individuos, usando GenAlEx® 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) con 999 permutaciones. Este valor se asoció con el análisis de la varianza molecular (AMOVA), que se realizó para estimar la varianza entre usos y dentro de cada sitio (Excoffier *et al.*, 1992).

La diferenciación genética también se analizó por aproximación Bayesiana, la cual no requiere conocimiento previo del nivel de endogamia dentro de las poblaciones, usando el programa Hickory® 1.1 (Holsinger & Lewis, 2003). Con este paquete se estimaron los parámetros θ^{II} (análogo bayesiano del F_{ST}) y f (análogo del F_{IS}) mediante simulaciones Monte Carlo de cadenas de Markov (en inglés MCMC). Los resultados se analizaron bajo cuatro modelos: el primero fue el modelo completo, donde $\theta^{II} \neq 0$ y $f \neq 0$. En el segundo se asumió que no hay endogamia dentro de las poblaciones, esto es $f = 0$ y $\theta^{II} \neq 0$; en el tercero, se consideró $\theta^{II} = 0$ (sin diferenciación entre las poblaciones) y $f \neq 0$. Por último, y debido a que las estimaciones de f basadas en marcadores dominantes pueden estar sesgadas (especialmente en tamaños de muestra menores que diez), se estimó el modelo (libre f) en el que la toma de muestras elige valores de f al azar de su distribución *a priori* mientras se estiman los otros parámetros. El programa se corrió utilizando los parámetros *burn-in*: 100000; número de muestras: 1000000; y *thinning*: 50 para los cuatro modelos. Los modelos se compararon con el criterio de información de la Devianza (DIC), que evalúa el ajuste del modelo y la complejidad, de manera que los modelos con menor DIC se ven favorecidos, y diferencias menores a cinco o seis unidades entre modelos indican que no hay evidencia para favorecer un modelo sobre otro (Holsinger *et al.*, 2002). Se calculó el intervalo de credibilidad al 95%, teniendo en cuenta que los intervalos de credibilidad en la estadística Bayesiana juegan un rol similar a los intervalos de confianza en la estadística clásica (de Aranzamendi *et al.*, 2008; Sesarini & Remis, 2008).

Para inferir la estructura genética y asignar los individuos a una población determinada, se utilizó el programa STRUCTURE® versión 2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.*, 2007). Se adoptó el modelo de mezcla y de frecuencias alélicas correlacionadas, utilizando *priors* no informativos para el set de datos a analizar. Para determinar el número óptimo de grupos (k), se corrió el programa STRUCTURE® con diferentes valores de k y con tres corridas independientes mediante cadenas de Markov de 10000 generaciones, cada una con descarte del 10% (*burn-in*: 1000) para cada valor de k .

2.6.2 Comunidad de artrópodos edáficos y características del suelo

Se registraron la abundancia promedio y la riqueza promedio observada de macro y microartrópodos (S), y se utilizó el estimador de Chao 1 (Chao, 1984) para el cálculo de la riqueza taxonómica ($S1$) de microartrópodos.

Los datos relevados a campo y los determinados en laboratorio se agruparon por uso y se promediaron para todas las fechas de muestreo. Para determinar diferencias estadísticamente significativas en el número de taxones, las densidades de macro y microartrópodos y en las variables físicas y químicas del suelo, se empleó el análisis de varianza no paramétrico para muestras independientes (prueba de Kruskal-Wallis). Se prefirió este análisis en vez del ANOVA clásico por ser más robusto, en los casos en que los datos no cumplieron con requisitos de normalidad, evaluada con el test de Shapiro–Wilks. Los análisis se realizaron con InfoStat® (InfoStat, 2008).

Para explorar las relaciones entre los artrópodos del suelo y el hábitat, se tuvieron en cuenta los datos de densidad de cada grupo faunístico. Para mostrar las relaciones entre variables físicas y químicas y abundancias de macro y microartrópodos, y aprovechando mejor la información de cada punto, se procedió en varios pasos usando análisis multivariados.

En primer término se realizó un análisis de tipo exploratorio, el análisis de componentes principales para la densidad de las comunidades de macro y microartrópodos, y para las variables físicas y químicas; este análisis reduce la dimensión de los datos asociando las variables en ejes artificiales (componentes principales) no correlacionados entre sí y que explican gran parte de la variabilidad total original (Velásquez *et al.*, 2007); la visualización del diagrama de dispersión de los puntos con su respectivo uso permite comprender qué variables influyen más en la caracterización general de los sitios. Los datos fueron estandarizados debido a que tenían distinta magnitud.

En segundo lugar, para determinar las relaciones entre los macro y microartrópodos y las variables físicas y químicas del suelo, se realizó un análisis de correlación canónica (ACC), generalización de la regresión múltiple, que encuentra la correlación máxima entre

las combinaciones lineales (variables canónicas) de los dos grupos de descriptores (Legendre & Legendre, 1999). Este tipo de análisis aporta información biológicamente significativa que puede estar enmascarada en el análisis de varianza debido a la dispersión intrínseca de los datos por tratamiento; los análisis de correlación y regresión son recomendados además porque aportan una estimación de parámetros que pueden volcarse a modelos de procesos (Cottingham *et al.*, 2005).

Por último, se realizó el análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales, PLS (del inglés, Partial Least Squares). Este método estadístico multivariado permite predecir un conjunto de variables dependientes (Y) desde un conjunto de variables predictoras (X). El objetivo del método PLS es describir Y a partir de X y su estructura de variación común. La técnica PLS busca una solución óptima o de compromiso entre el objetivo de explicar la máxima variación en X y encontrar las correlaciones de éstas con Y (Balzarini *et al.*, 2008).

Los grupos taxonómicos que estuvieron representados con densidades menores al 1% de la densidad total no se consideraron en los análisis multivariados. Los análisis se realizaron con InfoStat® (InfoStat, 2008).

Capítulo 3

Análisis de la variabilidad genética de *Armadillidium vulgare* (Latreille, 1804) en diferentes usos del suelo

3.1 Introducción

La plasticidad fenotípica es la capacidad de un organismo de producir diferentes fenotipos en respuesta a cambios ambientales (Gianoli, 2004). Hace algunas décadas se empezó a considerar el valor adaptativo de la plasticidad en las respuestas morfológicas y fisiológicas de los genotipos individuales a los ambientes que encuentran. La plasticidad fenotípica es un carácter en sí misma, por lo que podría estar sujeta a selección natural y consecuentemente podría ser materia prima de la evolución (Schlichting & Levin, 1986).

Existe la hipótesis general de que las especies con amplio rango de distribución presentan mayor plasticidad fenotípica que las especies con distribución limitada (Futuyma & Moreno, 1988). En este contexto, se podría explicar el éxito de una especie en colonizar nuevos sitios de dos maneras; por un lado, el modelo del ecotipo localmente adaptado, que establece que cada población de una especie particular una vez establecida, experimenta cambios diferenciales en sus frecuencias alélicas como resultado de las presiones de selección local. De acuerdo con esto, la diferenciación en ecotipos especializados se acomodaría a las diferencias ambientales entre hábitats y el rango de distribución de la especie surgiría del agregado total de estas poblaciones localmente adaptadas (Dudley, 1996). Otra forma de explicar el éxito de colonización es por el modelo alternativo, que supone que los individuos de especies ampliamente distribuidas conservan el potencial de responder plásticamente a los cambios ambientales. De esta manera, el rango de distribución de la especie dependerá de la amplitud de la tolerancia ambiental (plasticidad fenotípica) de los individuos (Gianoli, 2004). Por lo tanto, la diferenciación intraespecífica podría ser el resultado de la plasticidad fenotípica de diferentes caracteres morfológicos, fisiológicos o comportamentales.

Por otro lado, una estructura de metapoblaciones con una dinámica de extinción y recolonización de nuevos sitios podría mostrar diferenciación genética entre subpoblaciones tanto a una escala espacial como a una temporal (Hanski & Gilpin, 1997). Esta subestructuración genética de *loci* neutrales a nivel espacial podría ser una consecuencia del aislamiento por distancia, y en este sentido, una especie con poca dispersión como los bichos bolita (*Armadillidium vulgare*) podrían ser posibles candidatos. Sin embargo, la subestructuración genética de una especie podría también ser consecuencia de la selección

diferencial de diversos hábitats o microhábitats (Johannesson & Mikhailova, 2004) y en este sentido podrían estar fuertemente relacionados con los patrones y procesos de adaptación local.

La evaluación de la distribución de la diversidad genética de *A. vulgare* se estimará usando marcadores genéticos neutrales ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeat o regiones intermedias entre secuencias simples repetidas). Los ISSRs son marcadores genéticos muy sensibles y se han utilizado para detectar y analizar la estructura genética de diferentes especies de invertebrados (Abbot, 2001; Vijayan *et al.*, 2006; Roux, 2007; de Aranzamendi *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2009; Manrique-Poyato *et al.*, 2013; de Aranzamendi *et al.*, 2014; Gasmi *et al.*, 2014; Palma *et al.*, 2015). El polimorfismo entre individuos de la misma población se puede detectar debido a que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el cebador (*primer*) y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada.

3.2 Resultados

Los cuatro cebadores más informativos usados en el análisis amplificaron 77 bandas (*loci*) en 215 individuos de *Armadillidium vulgare* testeados. Los productos de PCR variaron en longitud, desde 150 hasta 3000 pares de bases (pb). Los *primers* ISSR 1, ISSR 3, ISSR 7 e ISSR 8 originaron 21, 19, 19 y 18 bandas, respectivamente (Ver Apéndice 2, Figuras A2, A3, A4 y A5). Todos los marcadores fueron polimórficos a nivel del 95%. El contenido de información polimórfica (PIC) fue mayor para el ISSR 1 (0.33) y menor para el ISSR 7 (0.28). En el mismo sentido, el porcentaje de amplificación de cada *primer* a través de las 215 muestras fue mayor para el ISSR 1 (61.9%) y menor para el ISSR 7 (50.23%). La probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo (PDICMA) fue baja para los cuatro cebadores, lo que indica su alta capacidad discriminatoria para reconocer que dos individuos son distintos (Tabla 5).

Tabla 5. Descriptiva para datos de marcadores.

<i>Primer</i>	Tamaño fragmentos (pb)	BT (BP)	PMF (95)	PIC (E.E)	AMP	PDICMA
ISSR 1	250 – 3000	21 (21)	1.00	0.33 (0.01)	61.90	$3.4 \cdot 10^{-12}$
ISSR 3	200 – 2000	19 (19)	1.00	0.30 (0.02)	52.13	$1.2 \cdot 10^{-11}$
ISSR 7	200 – 2000	19 (19)	0.95	0.28 (0.02)	50.23	$3.0 \cdot 10^{-10}$
ISSR 8	150 – 1200	18 (18)	1.00	0.31 (0.01)	60.48	$3.4 \cdot 10^{-11}$
Total		77 (77)			56.28	$4.1 \cdot 10^{-43}$

BT: número de bandas totales; BP: número de bandas polimórficas; PMF (95): proporción de *loci* polimórficos; PIC: contenido de información polimórfica promedio; EE: error estándar del PIC; AMP: porcentaje de amplificación del *primer*; PDICMA: probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo.

3.2.1 Variabilidad genética

El número de bandas polimórficas de *A. vulgare* registradas por uso varió desde 70 en el agrícola de UNLu a 76 en el pastizal naturalizado de UNLu. Del total de bandas amplificadas, solamente el pastizal de UNLu presentó una banda exclusiva. El porcentaje de *loci* polimórficos observado fue más alto en el pastizal de UNLu (98.7%); mientras que el más bajo se presentó en el agrícola UNLu (90.9%). En el caso de Etchegoyen, el número de bandas polimórficas fue menor en el agrícola (71), con menor promedio de *loci* polimórficos (92.2%). Los usos agrícolas de ambos campos (UNLu y Etchegoyen) mostraron el menor número de alelos (*Na*) y el menor número efectivo de alelos (*Ne*). Sin embargo, la diferencia en el número efectivo de alelos fue significativa sólo entre el uso agrícola y el pastizal naturalizado de la UNLu ($P = 0.0110$; Tabla 6).

Tabla 6. Patrón de bandas de los marcadores ISSR analizados en 215 individuos de *A. vulgare* en diferentes usos en UNLu ($n = 117$) y Etchegoyen ($n = 98$).

	<i>n</i>	Bandas polimórficas	Bandas Únicas	<i>P</i> (%)	<i>Na</i>	<i>Ne</i>
NU	37	76	1	98.7	1.99 (0.11)	1.69 (0.27) A
GU	47	72	0	93.5	1.96 (0.25)	1.61 (0.34) AB
AU	33	70	0	90.9	1.87 (0.44)	1.52 (0.33) B
Media				94.4 (2.4)	1.94 (0.30)	1.61 (0.32)
NE	33	75	0	97.4	1.95 (0.28)	1.61 (0.32)
GE	34	75	0	97.4	1.97 (0.16)	1.62 (0.32)
AE	31	71	0	92.2	1.90 (0.38)	1.56 (0.34)
Media				95.7 (1.6)	1.94 (0.29)	1.60 (0.33)

n: Número de individuos por sistema; *P*: Porcentaje de *loci* polimórficos; *Na*: Número de alelos; *Ne*: Número efectivo de alelos. Media (D.E.). Letras distintas indican diferencias significativas entre usos dentro de cada sitio ($P < 0.05$).

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

La diversidad genética (h) mostró una considerable variación entre usos dentro de cada sitio (Figura 6). Los valores de h registrados estuvieron entre 0.309 y 0.389. El sistema naturalizado de la UNLu mostró el valor más alto de diversidad genética. El test de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas para los valores de h entre el uso agrícola y el pastizal naturalizado en el campo de la Universidad de Luján ($P = 0.0125$; Figura 6 A); mientras que en el campo de Etchegoyen, las diferencias en la diversidad genética no fueron significativas entre los tres usos evaluados ($P = 0.5779$; Figura 6 B).

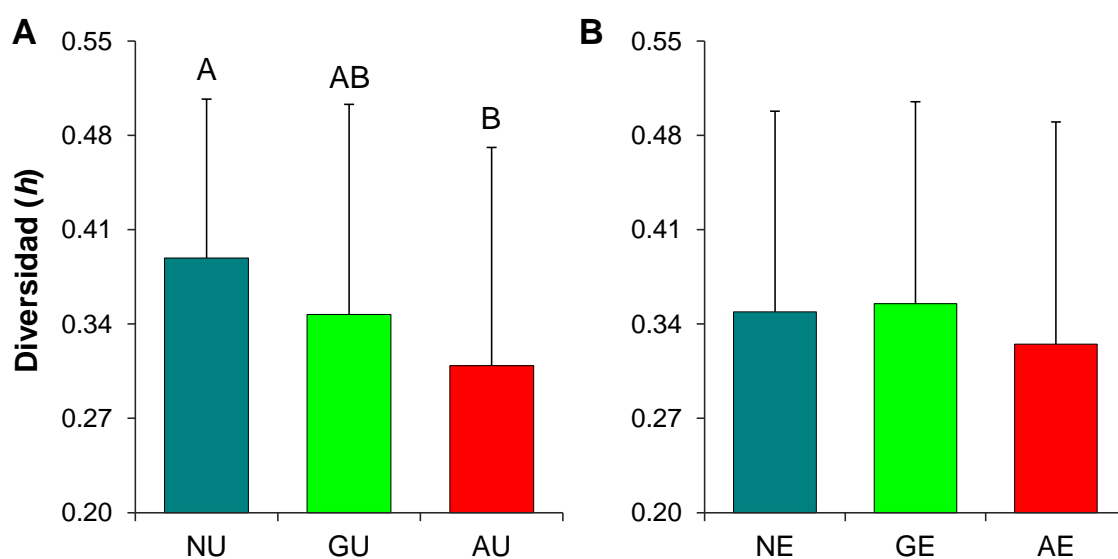


Figura 6. Diversidad genética (h) en UNLu (A) y Etchegoyen (B). Las barras indican la desviación estándar ($n= 77$). Letras distintas indican diferencias significativas entre usos ($P < 0.05$).

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

Por su parte, el índice de información de Shannon (I), que es un estimador de la variabilidad genética fue, dentro de cada campo, menor en los usos agrícolas (Figura 7), aunque esta diferencia fue significativa entre el pastizal naturalizado y el uso agrícola de la UNLu ($P= 0.0125$; Figura 7 A); mientras que en Etchegoyen no se registraron diferencias entre los usos ($P= 0.5966$; Figura 7 B).

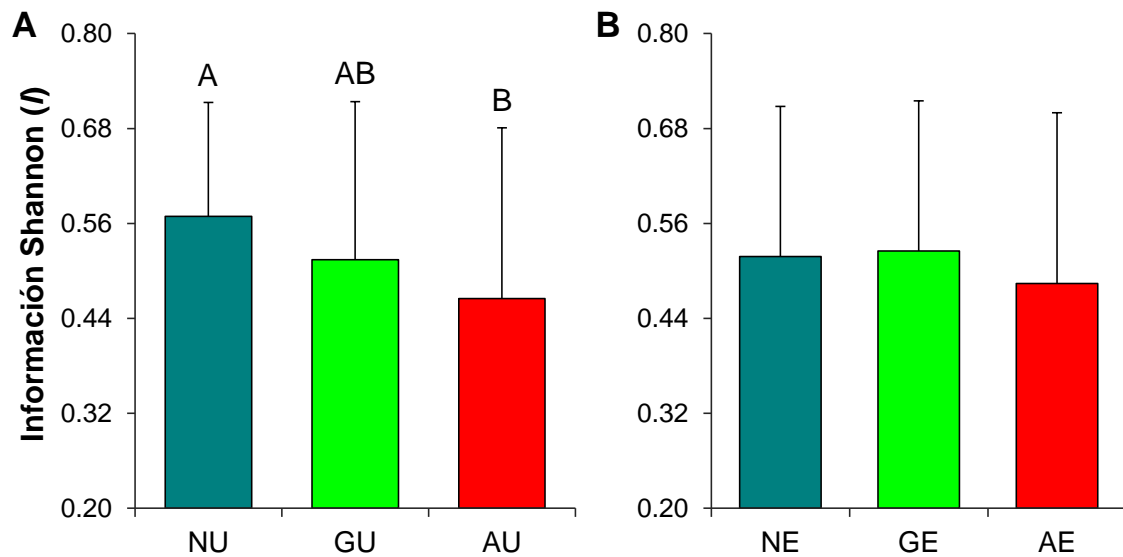


Figura 7. Índice de información de Shannon (I) en UNLu (A) y Etchegoyen (B). Las barras indican la desviación estándar ($n= 77$). Letras distintas indican diferencias significativas entre usos ($P < 0.05$).

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

3.2.2 Distancias genéticas

Se calcularon las distancias genéticas de Nei & Li (1979) entre pares de individuos por sitio y se utilizaron para el análisis de coordenadas principales. En el campo de la Universidad de Luján, las primeras tres coordenadas explicaron un bajo porcentaje del total de la variación (PCo 1: 7.6%; PCo 2: 7.0%; y PCo 3: 5.3%). No obstante, se observa que los individuos del pastizal naturalizado (verde oscuro) se podrían agrupar y separar por la PCo1, de una nube que incluye a los individuos de los usos agrícola (rojo) y ganadero (verde; Figura 8).

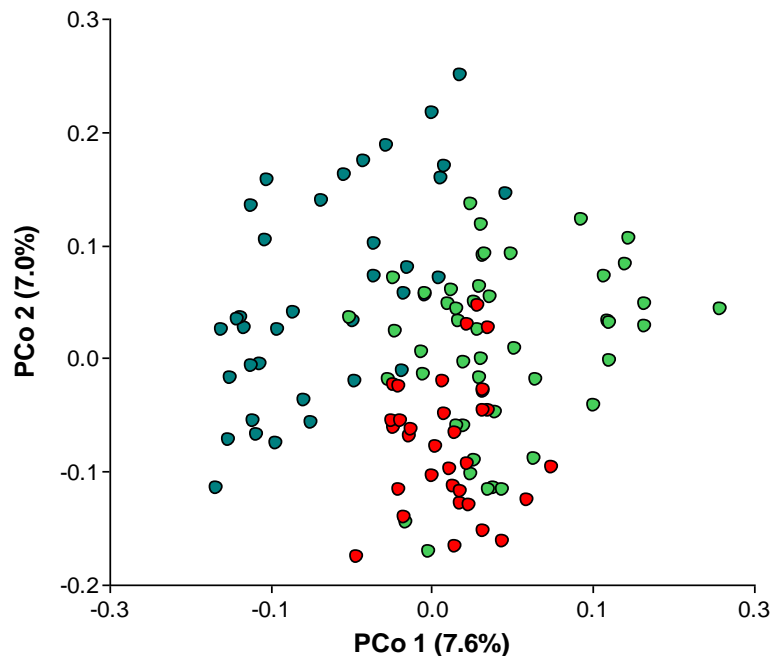


Figura 8. Análisis de Coordenadas Principales (PCo) basado en la distancia genética Nei & Li (1979) entre pares de individuos de *A. vulgare* en UNLu. Los símbolos representan a los individuos de acuerdo con el uso de procedencia.

●: Pastizal Naturalizado; ●: Ganadero; ●: Agrícola.

Asimismo, en el caso de Etchegoyen, el análisis de coordenadas principales explicó un bajo porcentaje de la variación: PCo 1: 8.8%; PCo 2: 5.6%; y PCo 3: 5.0%. En este análisis también los individuos del pastizal (verde oscuro) se agruparon; por su parte, los individuos del uso agrícola (rojo) estuvieron más dispersos en el plano de las dos primeras

coordenadas, mientras que los del uso ganadero (verde) se agruparon en la parte inferior del plano (Figura 9).

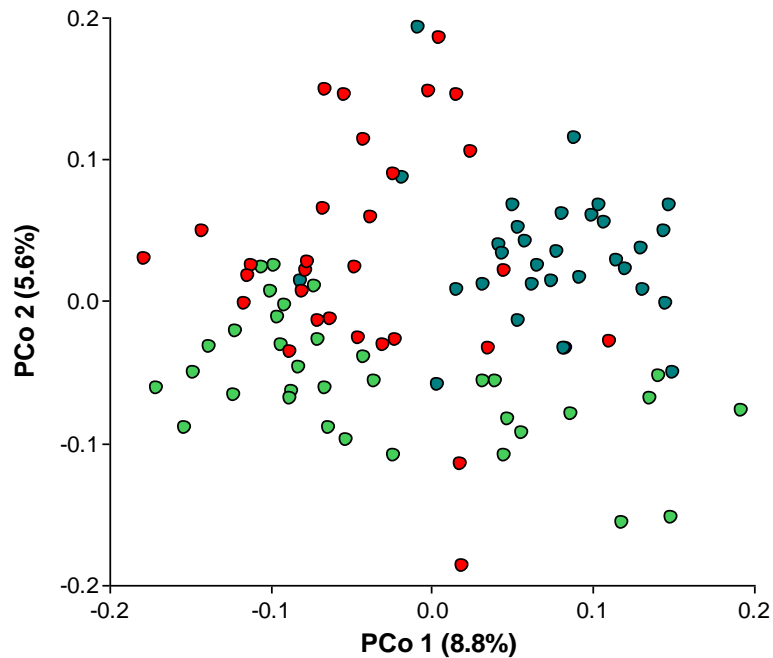


Figura 9. Análisis de Coordenadas Principales (PCo) basado en la distancia genética Nei & Li (1979) entre pares de individuos de *A. vulgare* en Etchegoyen. Los símbolos representan a los individuos de acuerdo con el uso de procedencia.

●: Pastizal Naturalizado; ●: Ganadero; ●: Agrícola.

Árboles de distancias (vecino más cercano)

El árbol de vecino más cercano (NJ) construido a partir de las distancias genéticas para el campo UNLu (Figura 10) mostró que los especímenes del pastizal naturalizado se agruparon en dos o tres ramificaciones de individuos claramente diferenciados, mientras que los individuos de los usos agrícola y ganadero presentaron al menos tres grupos cada uno, aunque dos de estos grupos compartieron individuos de ambos.

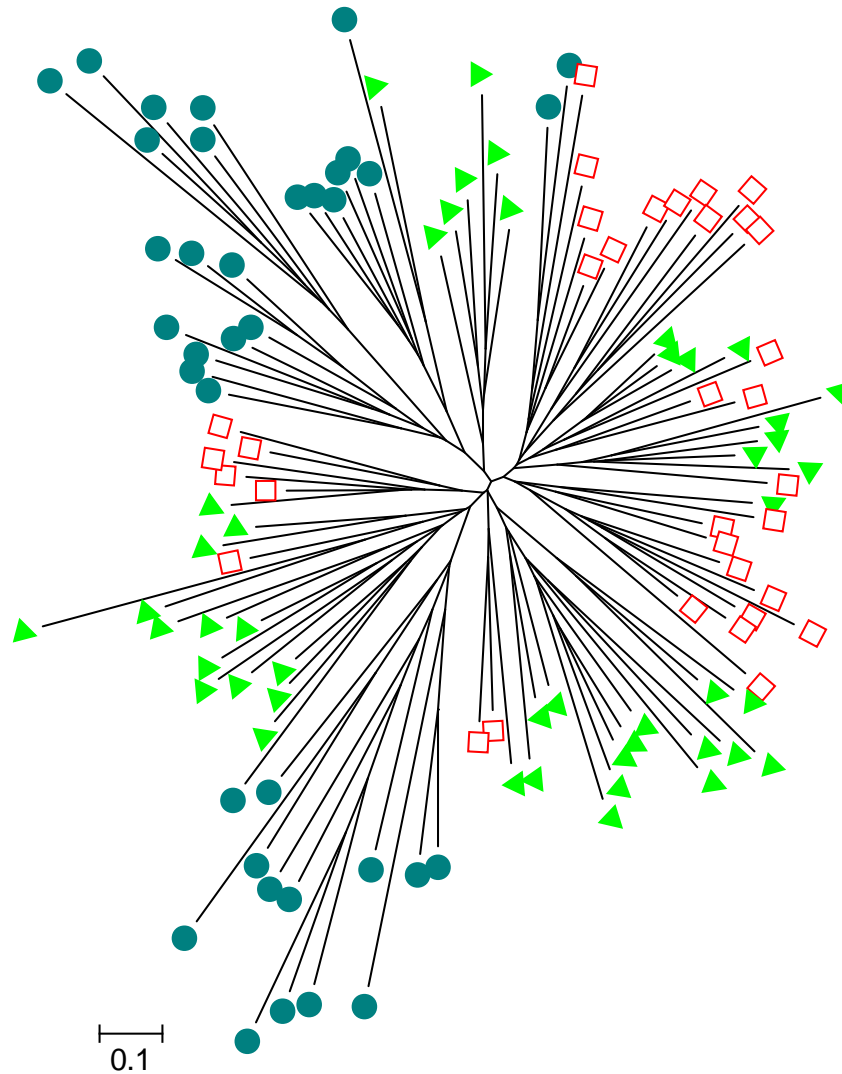


Figura 10. Árbol NJ basado en las distancias genéticas entre pares de individuos de *A. vulgare* en UNLu. Los símbolos representan a los individuos de acuerdo con el uso de procedencia.

●: Pastizal Naturalizado; ▼: Ganadero; □: Agrícola.

En el caso del árbol obtenido usando el método de vecino más cercano (NJ) para Etchegoyen, la mayoría de los individuos del pastizal se agruparon principalmente en una sola ramificación, mientras que los individuos de los usos agrícola y ganadero mostraron una rama con individuos de su uso y otras ramas con individuos de ambos usos (Figura 11).

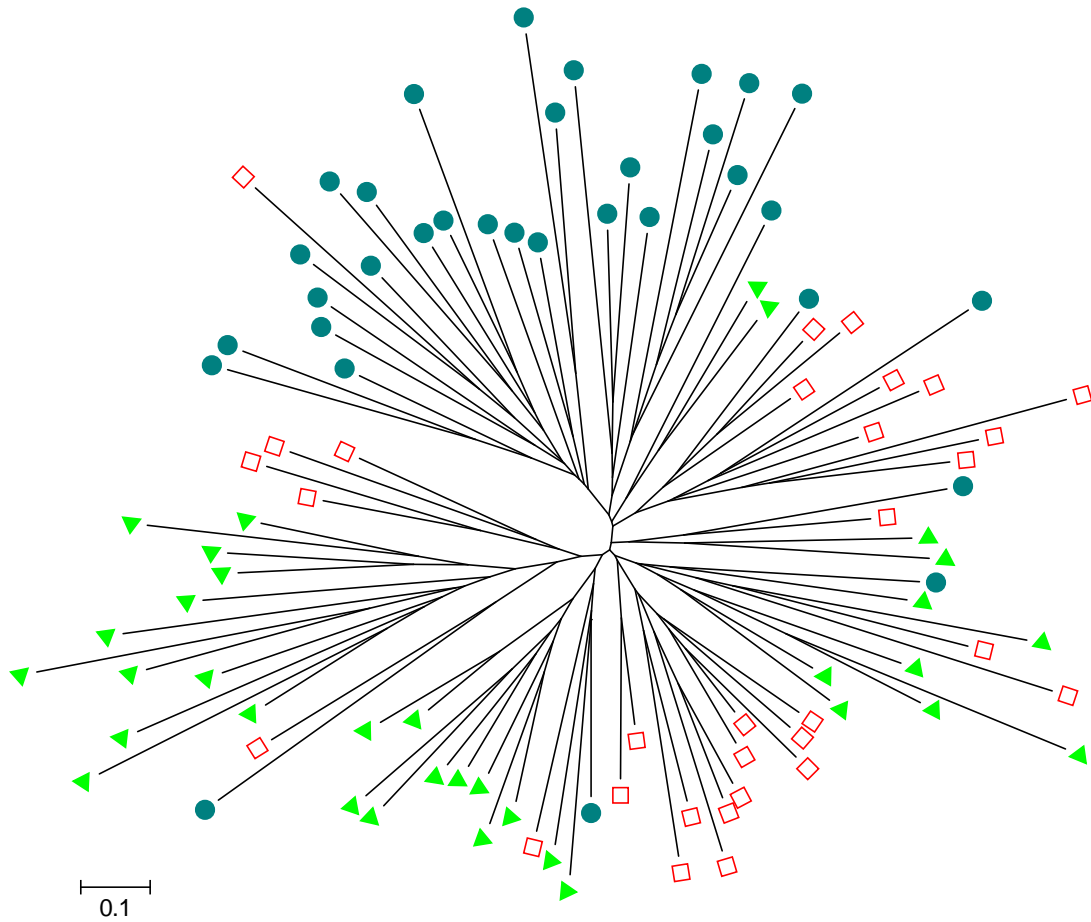


Figura 11. Árbol NJ basado en las distancias genéticas entre pares de individuos de *A. vulgare* en Etchegoyen. Los símbolos representan a los individuos de acuerdo con el uso de procedencia.

●: Pastizal Naturalizado; ▼: Ganadero; □: Agrícola.

Aislamiento por distancia

Los resultados del test de Mantel sugirieron que hubo una débil aunque significativa correlación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica en UNLu ($r = 0.368$, $P = 0.001$) y en Etchegoyen ($r = 0.222$, $P = 0.001$). El modelo de regresión lineal explicó el 13.6% de la varianza entre ambas distancias en UNLu ($R^2 = 0.1358$; Figura 12); mientras que en Etchegoyen, el modelo lineal explicó cerca del 5.0% ($R^2 = 0.0495$; Figura 13).

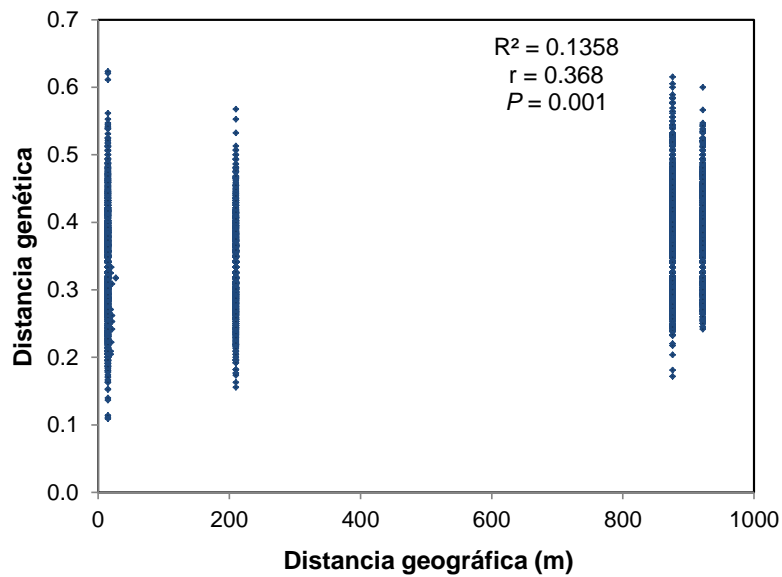


Figura 12. Test de Mantel UNLu.

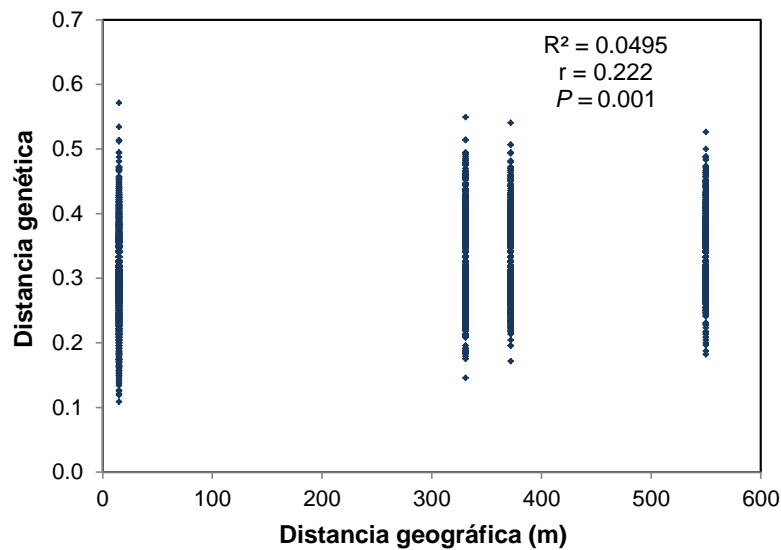


Figura 13. Test de Mantel Etchegoyen.

3.2.3 Diferenciación y estructura genética

En primer lugar, se utilizó para este análisis el coeficiente de diferenciación genética F_{ST} , clasificando la diferenciación en “baja” (0 – 0.05), “moderada” (0.05 – 0.15), “grande” (0.15 – 0.25) y “muy grande” (> 0.25) según el valor del coeficiente, siguiendo el criterio de Wright (1978). Este coeficiente se calculó para cada sitio (UNLu y Etchegoyen) en conjunto y comparando entre pares de usos para cada sitio (Tabla 7). Los valores de F_{ST} fueron mayores a 0.05 entre el pastizal naturalizado y el agrícola (0.0882) y entre pastizal naturalizado y el ganadero (0.0607) en el campo de la Universidad de Luján, y entre el pastizal naturalizado y el ganadero (0.0542) en Etchegoyen, correspondiendo en estos casos a una diferenciación genética moderada. Por otra parte, el estadístico F_{ST} mostró una baja diferenciación genética entre los usos ganadero y agrícola en UNLu (0.0471); mientras que en Etchegoyen la diferenciación entre los usos ganadero y agrícola no fue significativa ($P > 0.05$).

En cuanto a los valores de Φ_{PT} calculados a partir de las distancias binarias mostraron la misma tendencia que los valores de F_{ST} , en cuanto que fueron mayores en UNLu y entre el pastizal naturalizado *versus* el uso ganadero y el uso agrícola (Tabla 7). En todos los casos, las diferencias genéticas fueron significativas.

Tabla 7. Diferenciación genética de *A. vulgare* entre usos dentro de cada sitio, estimados usando los índices F_{ST} (Lynch & Milligan) y Φ_{PT} . Valores de probabilidad (P) basados en 999 permutaciones.

	F_{ST}	P	Φ_{PT}	P
UNLu	0.0659	< 0.0001	0.101	0.001
NU – GU	0.0607	0.0014	0.101	0.001
NU – AU	0.0882	0.0004	0.128	0.001
GU – AU	0.0471	0.0060	0.076	0.001
Etchegoyen	0.0405	0.0004	0.082	0.001
NE – GE	0.0542	0.0070	0.099	0.001
NE – AE	0.0415	0.0212	0.085	0.001
GE – AE	0.0244	0.0749	0.060	0.001

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

El análisis molecular de la varianza (AMOVA) para *A. vulgare* mostró que la divergencia entre usos fue mayor para el campo de la Universidad Nacional de Luján que para Etchegoyen (Tabla 8). En UNLu, el AMOVA indicó que hubo baja pero significativa diferenciación genética entre los usos ($\Phi_{PT} = 0.101$; $P = 0.001$), con el 90% de la variabilidad genética global que ocurrió dentro de los grupos y el 10% de la variación entre usos. En Etchegoyen por su parte, el AMOVA sugirió menor diferenciación genética entre usos ($\Phi_{PT} = 0.082$; $P = 0.001$), con tan sólo el 8% de diferenciación entre usos y el 92% restante correspondió a la variabilidad genética global dentro de los usos (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen del Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) para los grupos de *A. vulgare* en UNLu y Etchegoyen ($P = 0.001$).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación (%)
UNLu				
Entre usos	2	147.00	1.55	10
Dentro de los usos	114	1573.55	13.80	90
Total	116	1720.65	15.35	100
Etchegoyen				
Entre usos	2	106.95	1.22	8
Dentro de los usos	95	1296.57	13.65	92
Total	97	1403.52	14.87	100

El análisis Bayesiano usando el programa Hickory mostró diferenciación genética dentro de cada sitio y entre todos los pares de comparaciones (Tabla 9). En todos los casos se prefirió el modelo completo (en negrita) a los otros tres modelos ($f = 0$, sin endogamia dentro de las poblaciones; $\theta^{II} = 0$, sin diferenciación entre poblaciones, análogo al F_{ST} ; y f libre) porque éste presentó los valores más bajos del criterio de información de la devianza (DIC), el cual asume diferencias entre tres y cinco unidades como relevantes. El modelo $f = 0$ mostró diferencias con el modelo completo (16.5 unidades para UNLu y 11.7 unidades en Etchegoyen), lo que sugiere que podría haber evidencias de cierta endogamia en las poblaciones analizadas. El modelo $\theta^{II} = 0$ mostró los valores más altos del DIC, sugiriendo

evidencias de diferenciación genética entre usos dentro de los sitios. El valor de θ^{II} (modelo completo) fue mayor en UNLu (0.1028) que en Etchegoyen (0.0737).

En la aproximación Bayesiana utilizada para analizar la diferenciación genética entre pares de usos dentro de cada sitio, también se prefirió el modelo completo a los otros tres modelos (en negrita; Tabla 9). En todos los casos, el modelo completo mostró diferencias con el modelo $f = 0$ (valores del DIC por encima de siete unidades), sugiriendo nuevamente alguna evidencia de cierta endogamia dentro de los usos. En el mismo sentido, el modelo $\theta^{\text{II}} = 0$ presentó los valores más altos del DIC en comparación con los otros tres modelos, lo que podría sugerir la diferenciación genética de *A. vulgare* entre usos.

Los promedios estimados de θ^{II} (modelo completo) para cada sitio (UNLu y Etchegoyen) y entre todos los pares de comparaciones, fueron muy similares a los valores promedio de Φ_{PT} estimados (Tabla 7) y mostraron la misma tendencia que los valores de F_{ST} , que fueron mayores en UNLu y entre el pastizal naturalizado *versus* ganadero y agrícola. Resultados similares entre la aproximación Bayesiana y la estimación clásica confirman la diferenciación genética de los grupos de *A. vulgare* entre usos dentro de cada sitio.

Tabla 9. Niveles de diferenciación genética (θ^{II}) de *A. vulgare* estimados por análisis Bayesiano. Media (intervalo de credibilidad 95%). Criterio de Información de Devianza.

	Modelo	θ^{II}	DIC
UNLu	Completo	0.1028 (0.0734 – 0.1336)	1233.05
	$f = 0$	0.0759 (0.0577 – 0.0978)	1249.50
	$\theta^{II} = 0$	-	1772.14
	Libre f	0.1435 (0.0968 – 0.2099)	1439.37
NU – GU	Completo	0.1001 (0.0639 – 0.1437)	855.452
	$f = 0$	0.0751 (0.0511 – 0.1066)	866.359
	$\theta^{II} = 0$	-	1155.89
	Libre f	0.1509 (0.0953 – 0.2233)	1013.18
NU – AU	Completo	0.1353 (0.0892 – 0.1918)	810.811
	$f = 0$	0.1033 (0.0713 – 0.1442)	823.767
	$\theta^{II} = 0$	-	1152.96
	Libre f	0.1775 (0.1195 – 0.2474)	938.408
GU – AU	Completo	0.0709 (0.0427 – 0.1082)	799.201
	$f = 0$	0.0544 (0.0345 – 0.0808)	810.099
	$\theta^{II} = 0$	-	975.086
	Libre f	0.1364 (0.0785 – 0.2152)	933.838
Etchegoyen	Completo	0.0737 (0.0503 – 0.1022)	1180.93
	$f = 0$	0.0579 (0.0425 – 0.0771)	1192.59
	$\theta^{II} = 0$	-	1512.74
	Libre f	0.1255 (0.0787 – 0.1936)	1340.86
NE – GE	Completo	0.0949 (0.0589 – 0.1401)	803.381
	$f = 0$	0.0722 (0.0478 – 0.1039)	816.815
	$\theta^{II} = 0$	-	1027.16
	Libre f	0.1510 (0.0946 – 0.2225)	927.072
NE – AE	Completo	0.0806 (0.0490 – 0.1219)	780.194
	$f = 0$	0.0626 (0.0402 – 0.0924)	790.183
	$\theta^{II} = 0$	-	961.363
	Libre f	0.1430 (0.0855 – 0.2182)	885.526
GE – AE	Completo	0.0553 (0.0322 – 0.0867)	779.102
	$f = 0$	0.0434 (0.0262 – 0.0666)	786.777
	$\theta^{II} = 0$	-	894.665
	Libre f	0.1237 (0.0666 – 0.2018)	885.223

Estructura genética

Se asignaron los individuos de *A. vulgare* a un número específico (k) de poblaciones a partir de sus genotipos y simultáneamente, se estimaron las frecuencias alélicas de los individuos de las poblaciones por medio de MCMC usando el programa Bayesiano STRUCTURE® (Pritchard *et al.*, 2000). Los resultados de este análisis para inferir la estructura poblacional, mostraron que el valor máximo promedio del ΔK fue obtenido con $k = 7$ en UNLu y $k = 2$ en Etchegoyen (Figura 14 A y B, respectivamente).

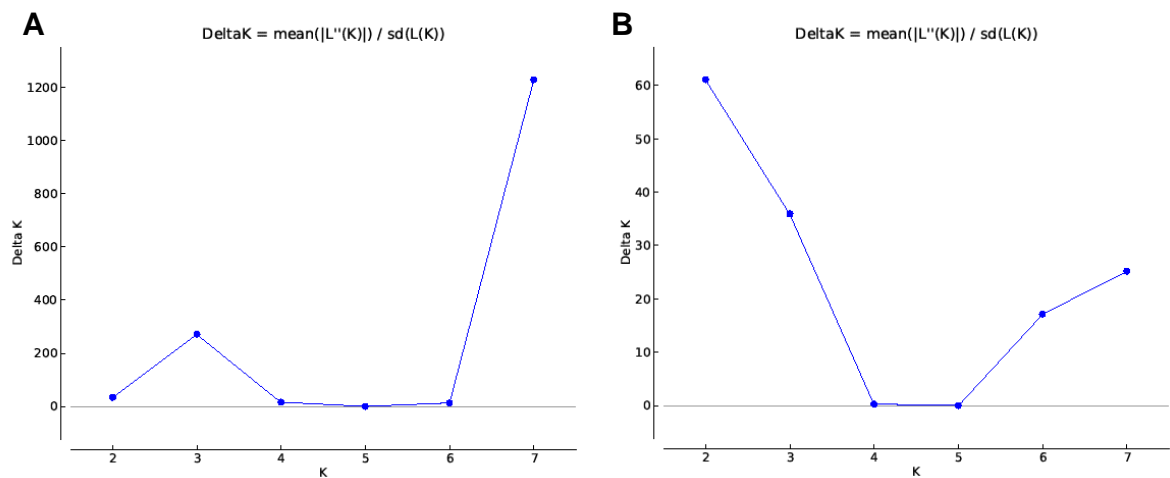


Figura 14. ΔK calculado por el método de Evanno *et al.* (2005) para UNLu (A) y Etchegoyen (B).

Estos valores de k indicarían una estructura de *A. vulgare* en siete grupos en UNLu: tres exclusivos en pastizal naturalizado (azul, rojo y amarillo), uno propio en ganadero (celeste) y uno propio del lote agrícola (naranja) y dos compartidos entre ganadero y agrícola (verde y violeta). Cada espécimen fue asignado a uno de estos siete grupos (Figura 15).

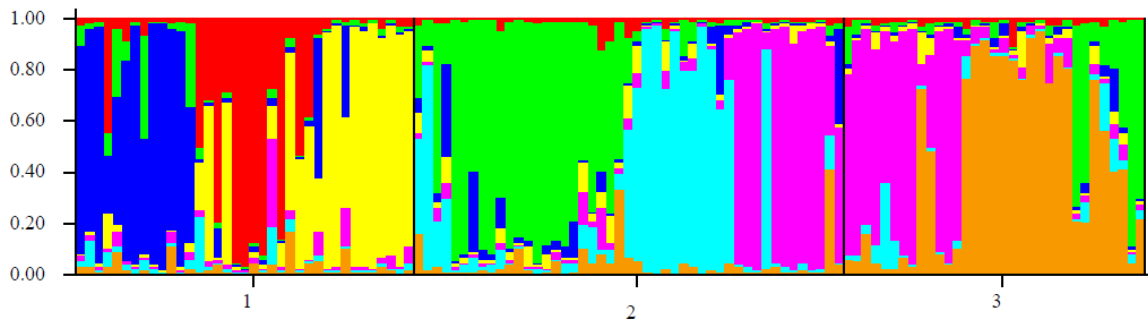


Figura 15. Patrones de diferenciación genética observados en *A. vulgare* en UNLu mediante el análisis Bayesiano de estructuración ($k = 7$). Diferentes colores representan diferentes grupos genéticos. Cada columna representa un individuo. La longitud de cada columna refleja la probabilidad de afiliación del individuo a un grupo.

1: Naturalizado; 2: Ganadero; 3: Agrícola.

Por otra parte, en Etchegoyen sólo se diferenciaron dos grupos genéticos compartidos en los tres usos: en el pastizal naturalizado con un grupo compartido (verde) y el ganadero y agrícola compartiendo dos grupos (verde y rojo) (Figura 16). Esto podría indicar que en Etchegoyen hay mayor intercambio de información genética entre ambos grupos.

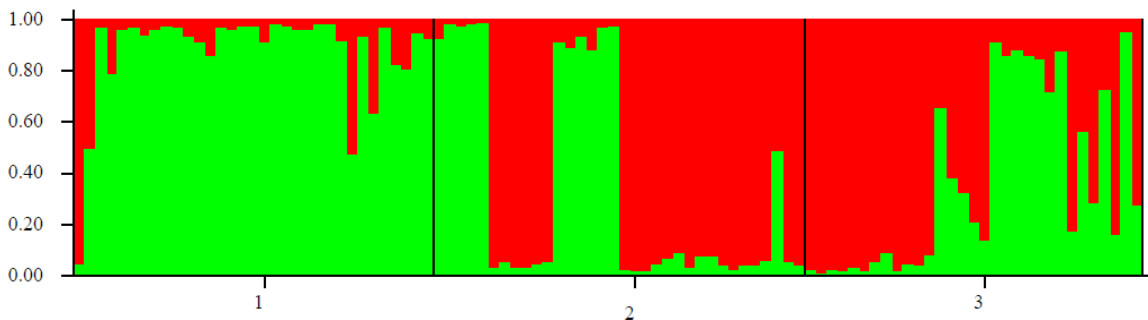


Figura 16. Patrones de diferenciación genética observados en *A. vulgare* en Etchegoyen mediante el análisis Bayesiano de estructuración ($k = 2$). Diferentes colores representan diferentes grupos genéticos. Cada columna representa un individuo. La longitud de cada columna refleja la probabilidad de afiliación del individuo a un grupo.

1: Naturalizado; 2: Ganadero; 3: Agrícola.

En síntesis, el campo UNLu posee una mayor variabilidad genética total que el campo Etchegoyen, con mayor diferenciación genética entre los distintos usos. Sin embargo, en ambos campos, el uso agrícola presenta una diversidad genética menor. En el caso del sitio UNLu, donde la estructura genética de la especie es más compleja, el lote de pastizal naturalizado se diferencia significativamente de los usos más perturbados (agrícola y ganadero).

Capítulo 4

Comunidad de macro y microartrópodos del suelo y propiedades físicas y químicas del suelo

4.1 Introducción

La complejidad inherente a los ecosistemas ha sido descrita por la Ecología mediante una serie de conceptos tales como estabilidad, integridad, madurez, resiliencia, salud, sostenibilidad, entre otros (Margalef, 1991). Aunque muchos de estos conceptos son auténticas "cajas negras" difíciles de cuantificar e incluso de definir, son necesarios para implementar la gestión de ecosistemas con base en la teoría ecológica. En este punto, la evaluación de artrópodos terrestres podría ser útil puesto que sus patrones de abundancia y diversidad no dependen de variables ambientales aisladas, sino de un intrincado conjunto de variables del suelo, de la topografía y de la vegetación.

La función ecológica de la fauna edáfica en los agroecosistemas es múltiple. Sus funciones, directas o indirectas, se pueden asociar con actividades que resultan en una influencia importante sobre el rendimiento vegetal a corto plazo como la herbivoría, la dispersión de microorganismos simbióticos de plantas, como fijadores de nitrógeno y hongos micorrícicos, y la capacidad de digerir de manera selectiva microorganismos patógenos; y, con actividades con influencia de menor intensidad, pero de efectos acumulativos en el largo plazo como la humificación, la mineralización de la materia orgánica y el impacto sobre la estructura y las propiedades físicas y químicas del suelo (Decäens *et al.*, 2003; Coleman *et al.*, 2004). Aunque las propiedades físicas y químicas de los suelos se han usado tradicionalmente para diagnosticar la calidad y salud de los agroecosistemas, la disminución de la capacidad productiva y la fertilidad del suelo se pueden detectar también por cambios en las poblaciones de los invertebrados edáficos (Brussaard *et al.*, 1997), por lo que la composición y abundancia de las comunidades de fauna del suelo tienen también valor potencial como indicadores biológicos (Pankhurtst *et al.*, 1997; Lavelle *et al.*, 2006; Barrios, 2007).

El estudio de la asociación entre las propiedades físicas y químicas del suelo, la composición y abundancia de los macro y microartrópodos edáficos y la intensidad de uso, tiene interés para desarrollar herramientas de monitoreo y diagnóstico. Diferentes estudios demuestran que factores como la humedad, el contenido de materia orgánica (Momo *et al.*, 1993; Domínguez *et al.*, 2010), la compactación, la intensificación agrícola (Aquino *et al.*, 2008b; Diekötter *et al.*, 2010; Feijoo *et al.*, 2010) o el tipo de cobertura vegetal (Dauber *et*

al., 2005; Falco & Momo, 2010) modifican significativamente la densidad, composición y distribución de las comunidades edáficas, las cuales seleccionan ambientes con coberturas capaces de disminuir los efectos de la temperatura y ofrecer diferentes recursos alimenticios. Así, en sitios con pastizales naturales o naturalizados, las comunidades de fauna del suelo suelen ser más diversas que en suelos usados para cultivos anuales o ganadería (Dauber *et al.*, 2005; Bedano *et al.*, 2006a, 2006b; Aquino *et al.*, 2008b; Diekötter *et al.*, 2010; Arolfo *et al.*, 2010; Díaz Porres *et al.*, 2014).

4.2 Resultados

4.2.1 Comunidad de artrópodos del suelo

Macroartrópodos

Los macroartrópodos del suelo colectados se agruparon en trece taxones: Araneae, Chilopoda, Diplopoda, Blattodea, Coleoptera, Dermaptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera, Hexapoda inmaduros, e Isopoda.

La densidad total de macroartrópodos fue mayor en los pastizales naturalizados de ambos sitios, UNLu y Etchegoyen, con 523 y 873 individuos/m², respectivamente. Mientras tanto, los usos agrícolas de ambos sitios mostraron densidades significativamente menores ($P < 0.05$), por debajo de 212 individuos/m². En los lotes con uso ganadero, la densidad total promedio fue de 380 individuos/m². En Etchegoyen, la densidad total de macroartrópodos mostró diferencias entre los tres usos evaluados, mientras que en UNLu las diferencias se registraron entre el pastizal naturalizado con los lotes ganadero y agrícola (Figura 17).

Por su parte, el número de grupos taxonómicos (Orden o Familia) fue significativamente mayor en el sistema naturalizado de Etchegoyen ($P < 0.10$), con promedio de 12 grupos y un valor máximo de 17 grupos registrados. Al igual que con la densidad total, el número de grupos fue menor en los lotes con uso agrícola, con promedio de seis en agrícola UNLu y siete en agrícola Etchegoyen (Tabla 10). El número de grupos de macroartrópodos no mostró diferencias entre los usos ganadero y agrícola de ambos sitios ($P > 0.05$).

Los grupos más abundantes fueron Isopoda, Hymenoptera, Diptera y Hemiptera, con 27%, 24%, 11% y 10% de la densidad total, respectivamente; mientras que Blattodea y Lepidoptera no estuvieron presentes en los sistemas agrícolas de ambos sitios, y mostraron abundancias por debajo del 1% (Tabla 10). La densidad de Chilopoda fue significativamente mayor en naturalizado Etchegoyen (44 individuos/m²), respecto a los demás sistemas que estuvieron entre 4 y 17 individuos/m² en promedio ($P < 0.0001$). Por su parte, los diplópodos

estuvieron ausentes en los usos ganadero y agrícola de UNLu, y no mostraron diferencias en la densidad entre los usos de Etchegoyen ($P = 0.0261$).

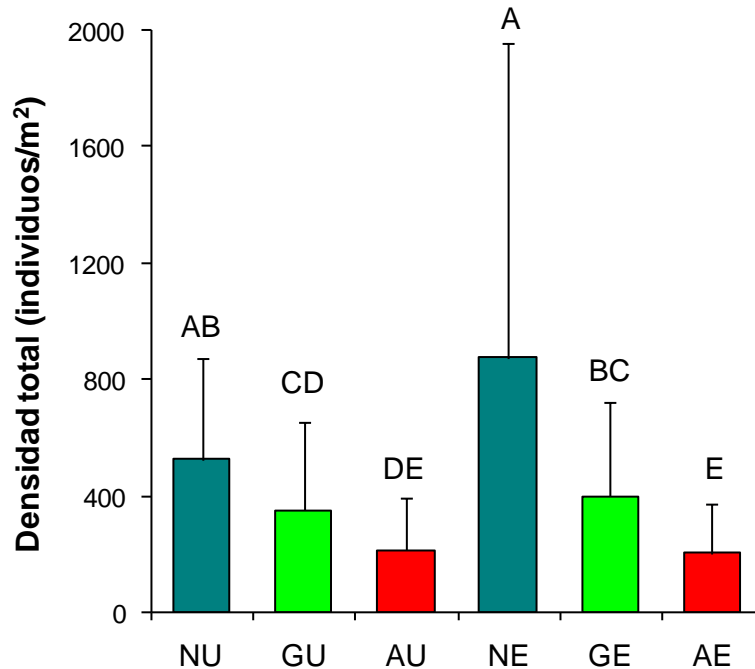


Figura 17. Densidad total (individuos/m²) de macroartrópodos del suelo. Las barras indican la desviación estándar ($n= 30$). Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas ($P < 0.05$).

NU: Pastizal Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Pastizal Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

Los Coleoptera fueron más abundantes en los pastizales naturalizados que en los sistemas agrícolas en ambos sitios; sin embargo las diferencias no fueron significativas ($P > 0.10$). Se colectaron dentro de este grupo especímenes de las familias Carabidae, Coccinellidae, Cupedidae, Curculionidae, Elateridae, Erotylidae, Histeridae, Scarabaeidae y Staphylinidae, siendo Coccinellidae y Staphylinidae más abundantes en lotes ganaderos y pastizales naturalizados, respectivamente. Entretanto, los hemípteros fueron más abundantes en naturalizado y ganadero de Etchegoyen, mostrando diferencias con el agrícola ($P = 0.0003$); mientras que en UNLu no se registraron diferencias entre los usos (Tabla 10). Representantes de las familias Cercopidae, Aphididae y Jassidae se colectaron dentro de este grupo.

Tabla 10. Densidad (individuos/m²) y número de grupos taxonómicos de la comunidad de macroartrópodos del suelo en los sistemas naturalizado (N), ganadero (G) y agrícola (A) de UNLu y Etchegoyen.

	NU			GU			AU			NE			GE			AE		
Araneae	34	(56)		39	(41)		24	(37)		18	(23)		24	(40)		15	(32)	ns
Chilopoda	17	(24)	B	6	(15)	B	4	(12)	B	44	(41)	A	6	(18)	B	4	(10)	B
Diplopoda	12	(19)	A	--		B	--		B	11	(23)	AB	3	(8)	AB	6	(17)	AB
Blattodea	--			2	(5)		--			5	(13)		--			--		ns
Coleoptera	55	(72)		43	(48)		35	(64)		50	(53)		31	(42)		21	(27)	ns
Dermaptera	1	(4)		3	(11)		4	(7)		6	(11)		2	(5)		7	(18)	ns
Diptera	21	(41)		85	(170)		31	(72)		44	(69)		52	(119)		42	(94)	ns
Hemiptera	41	(84)	C	21	(43)	C	12	(15)	BC	122	(240)	A	59	(64)	AB	5	(11)	C
Hymenoptera	89	(169)	BC	24	(62)	C	12	(22)	C	392	(995)	A	76	(107)	AB	20	(24)	BC
Lepidoptera	4	(9)		2	(5)		--			4	(9)		3	(8)		--		ns
Orthoptera	--			4	(15)		1	(4)		1	(4)		3	(6)		1	(4)	ns
L Hexapoda*	29	(41)	A	26	(25)	A	32	(39)	A	38	(71)	A	15	(25)	AB	30	(105)	B
Isopoda	220	(105)	A	94	(55)	BC	57	(46)	CD	139	(80)	B	124	(80)	B	49	(58)	D
Número de grupos*	9	(2)	AB	9	(5)	B	6	(3)	B	12	(3)	A	9	(4)	B	7	(2)	B

Valores corresponden a la Media (D.E.). Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sistemas para el mismo grupo taxonómico. * Diferencias significativas ($P < 0.10$).

De otra parte, las hormigas presentaron un gradiente de densidad $NE > NU > GE > GU > AE > AU$ (Tabla 10). Los rangos de densidad de Formicidae fueron notoriamente menores en los sistemas agrícolas, exponiendo diferencias significativas con los pastizales naturalizados en ambos sitios ($P = 0.0008$).

Los estados inmaduros de Hexapoda fueron más abundantes en los lotes de UNLu, y en Etchegoyen se registraron diferencias entre el naturalizado y el agrícola ($P < 0.10$). Por su parte, los isópodos terrestres fueron el grupo más abundante en el pastizal naturalizado de la UNLu (42% de la densidad total), mostrando diferencias con los usos ganadero y agrícola ($P < 0.05$); mientras que en Etchegoyen, la densidad de Isopoda fue significativamente menor en el uso agrícola, respecto a los otros dos usos (Tabla 10). Los otros taxones no mostraron diferencias significativas entre usos del suelo. Cabe resaltar que para la mayoría de los grupos faunísticos, las menores densidades se registraron en los sistemas agrícolas, en los cuales los grupos más abundantes dentro del uso fueron Diptera y Hexapoda inmaduros.

En la Figura 18 se presenta el ordenamiento de los sistemas según la densidad de los principales grupos de macroartrópodos encontrados, mediante un análisis de componentes principales. Los dos primeros componentes explicaron el 75.4% (46.7 y 28.7%) de la variabilidad total. El CP1 se asoció con mayores densidades de Chilopoda, Hymenoptera, Hemiptera y Diplopoda, y separó claramente a los pastizales naturalizados de los sistemas agrícolas y ganaderos de ambos sitios. El CP2 creció con la densidad de Dermaptera y decreció con Araneae; además mostró fuerte relación entre el uso naturalizado de la UNLu con los isópodos y coleópteros, y separó a los sistemas agrícolas de los ganaderos.

Estos resultados muestran que la comunidad de macroartrópodos difiere según el uso y que, en líneas generales, las abundancias totales y la riqueza de taxones son mayores en los campos naturalizados y menores en los campos agrícolas, quedando los ganaderos en un punto intermedio. Esto es razonable si se tiene en cuenta, por un lado, la influencia de la cobertura vegetal sobre estos grupos, y por otro, los efectos deletéreos de las prácticas agrícolas, sobre todo la aplicación de agrotóxicos.

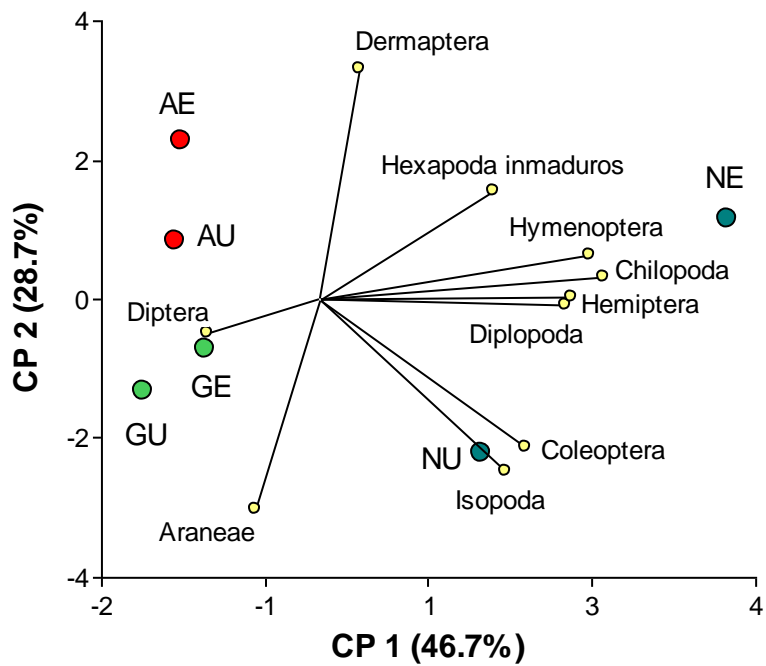


Figura 18. Proyección de los sistemas en el plano factorial de los dos primeros componentes principales para la densidad de grupos de macroartrópodos del suelo.

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

Microartrópodos

Los microartrópodos del suelo se analizaron en dos grandes grupos: Acari y Collembola. Cabe destacar que se colectaron otros grupos de la mesofauna tales como Symphyla, Protura y Diplura, que registraron densidades por debajo del 1% del total, por lo tanto, no se analizaron por separado.

La comunidad de microartrópodos en conjunto registró menor riqueza¹ observada (*S*) y menor riqueza taxonómica estimada (*S1*; Chao, 1984) en suelos agrícolas y ganaderos de ambos sitios, en comparación con los valores observados en los pastizales naturalizados. Tanto en UNLu como en Etchegoyen hubo diferencias significativas en la riqueza observada entre el sistema naturalizado respecto al ganadero y al agrícola ($P = 0.0302$). La riqueza taxonómica estimada no mostró diferencias entre usos en ninguno de los dos sitios (Tabla 11).

Tabla 11. Riqueza observada (*S*) y estimada (*S1*; Chao, 1984) de la comunidad de microartrópodos del suelo en los sistemas naturalizado (N), ganadero (G) y agrícola (A) de UNLu y Etchegoyen. Media (D.E.). Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre sistemas.

	<i>S</i>			<i>S1</i>	
NU	9	(3)	A	20	(15)
GU	6	(3)	C	8	(4)
AU	6	(2)	BC	9	(3)
NE	9	(2)	AB	19	(11)
GE	5	(3)	C	11	(11)
AE	4	(4)	C	11	(14)

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

¹ Por razones de simplicidad se hablará de “riqueza” aunque debe recordarse que se trata de número de grupos taxonómicos de niveles más altos.

La comunidad de ácaros registró la máxima densidad en el sistema naturalizado de Etchegoyen (8255 individuos/m²), mientras que la mínima se observó en el ganadero del mismo sitio (1726 individuos/m²). La abundancia de Acari no mostró diferencias entre usos para el sitio UNLu, mientras que en Etchegoyen, se diferenció el sistema naturalizado del agrícola y del ganadero ($P = 0.0013$; Figura 19). Oribatida y Astigmata fueron los taxones más abundantes, mientras que Prostigmata presentó la menor densidad, mostrando ausencias en el agrícola UNLu. Los estados juveniles de Acari fueron más abundantes en lotes ganaderos de ambos sitios y en el agrícola de Etchegoyen (Figura 20).

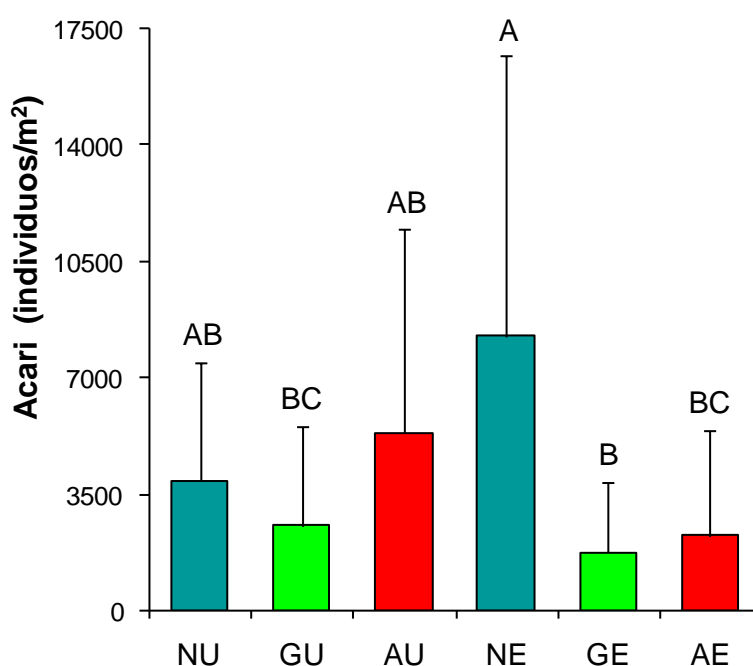


Figura 19. Densidad total de Acari (individuos/m²). Las barras indican la desviación estándar ($n= 30$). Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas ($P < 0.05$).

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

Los colémbolos, por su parte, fueron más abundantes en el uso agrícola del campo de la UNLu (7017 individuos/m²), mostrando diferencias significativas con el sistema naturalizado del mismo sitio ($P = 0.0033$); mientras que en Etchegoyen, las diferencias fueron notorias entre el naturalizado y ganadero, este último con la menor densidad

registrada (750 individuos/m², Figura 21). Los principales integrantes de este grupo pertenecen a los órdenes Poduromorpha, Entomobryomorpha y Symphypleona.

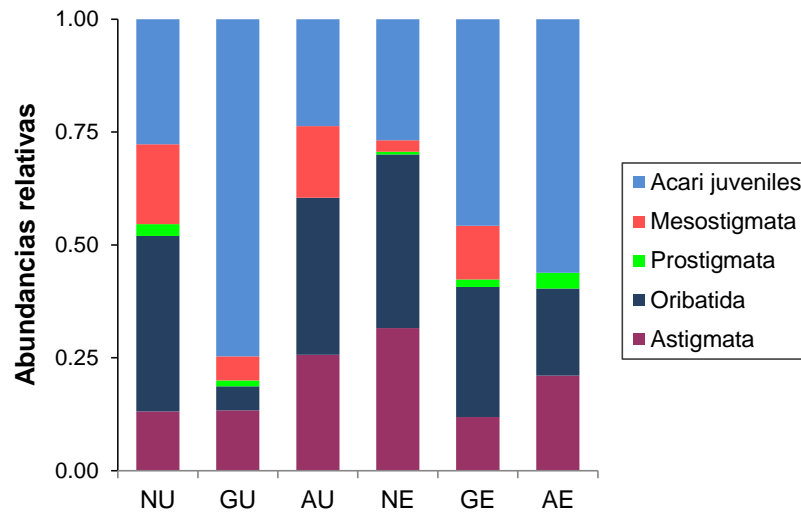


Figura 20. Abundancias relativas de los taxones de Acari.

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

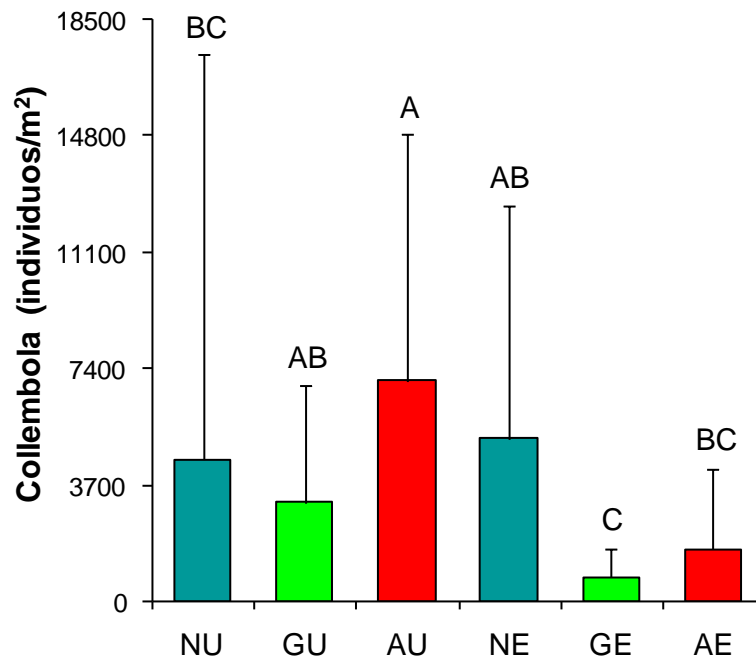


Figura 21. Densidad total de Collembola (individuos/m²). Las barras indican la desviación estándar ($n=30$). Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas ($P < 0.05$).

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

La distribución de los órdenes de Collembola dentro de cada uso y sitio se muestra en la Figura 22. Poduromorpha fue el grupo más abundante, registrando abundancias relativas por encima del 50% en todos los sistemas. Dentro de este orden se destacan las familias Poduridae, Hypogastruridae y Onychiuridae. En segundo lugar estuvo el orden Entomobryomorpha, con especímenes de las familias Isotomidae y Entomobryidae. Este orden mostró mayor densidad en sistemas ganaderos y agrícolas de ambos sitios. Por último, Symphyleona fue menos abundante en lotes con uso agrícola y más denso en lotes con uso ganadero. Individuos de la familia Sminthuridae fueron colectados en este grupo.

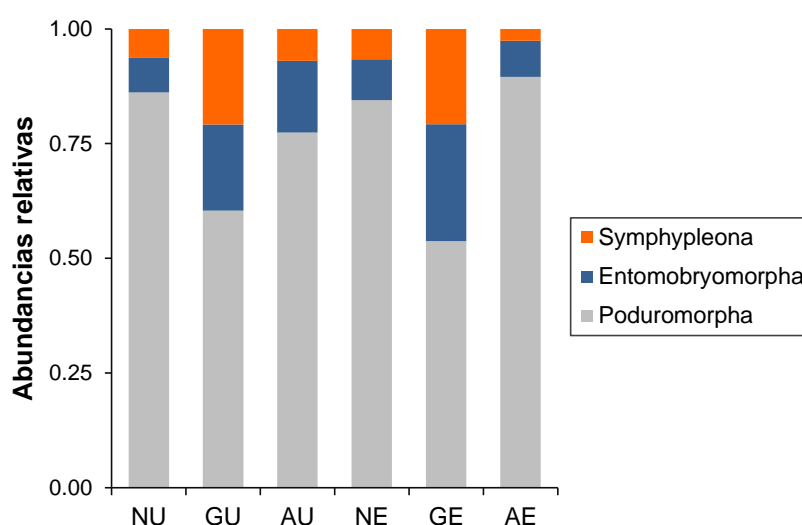


Figura 22. Abundancias relativas de los órdenes de Collembola.

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

Los resultados del ACP para la densidad de grupos de microartrópodos del suelo se muestran en la Figura 23. Los dos primeros componentes del análisis explicaron el 85.2% de la variabilidad total. El primer componente (67.2%) se asoció con mayores densidades de Poduromorpha y ácaros oribátidos registrados en el pastizal naturalizado, separando a este sistema de los otros dos usos (agrícola y ganadero) evaluados en Etchegoyen y, que presentaron mayor abundancia de ácaros Prostigmata. El segundo componente (18.1%) creció con los ácaros Astigmata, que fueron asociados con el sistema naturalizado Etchegoyen y decreció con Symphyleona y Entomobryomorpha, más abundantes en el uso ganadero de la UNLu.

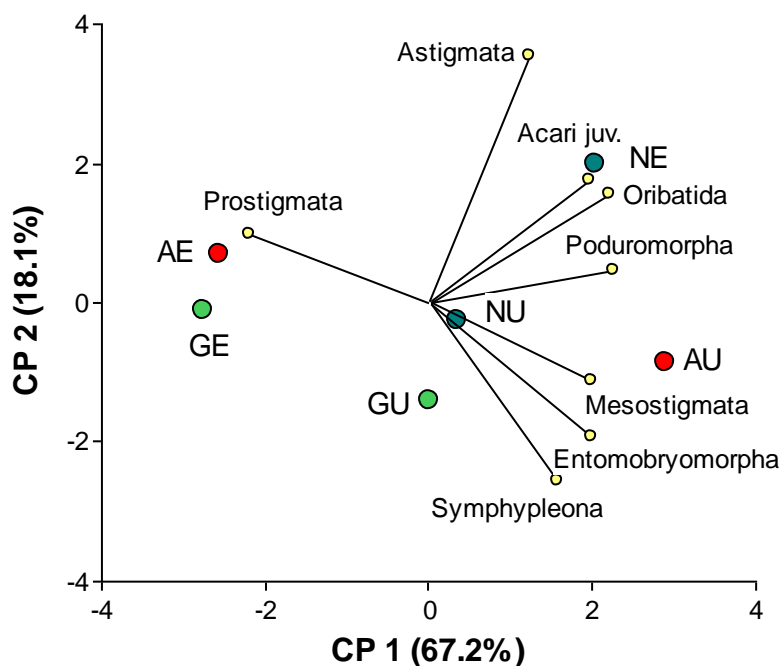


Figura 23. Proyección de los sistemas en el plano factorial de los dos primeros componentes principales para la densidad de grupos de microartrópodos del suelo.

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

La densidad y el número de grupos de la mesofauna (microartrópodos) en este estudio no mostró un patrón claro de variación con respecto a los usos. Probablemente sea necesario evaluar los datos utilizando un nivel de resolución taxonómica más fino. Tal vez a nivel de familias o especies se observen cambios de composición que puedan ser indicativos de la intensidad de perturbación.

4.2.2 Propiedades físicas y químicas del suelo

El análisis de cada variable física y química en particular permitió evaluar el efecto de cada uso sobre éstas. Los datos relevados se agruparon por sistema y se promediaron para todas las fechas de muestreo.

La densidad aparente (DA), medida por el método del cilindro, mostró valores promedio de 1.13 g/cm^3 en lotes con pastizal naturalizado, y por encima de 1.22 g/cm^3 en lotes con uso ganadero. El test de Shapiro–Wilks mostró que este parámetro tenía distribución normal ($P = 0.1279$), por lo que se realizó el análisis de varianza paramétrico. La DA fue significativamente superior ($P < 0.05$) en los usos ganaderos de ambos sitios y en el agrícola de la UNLu, con respecto a los pastizales naturalizados (Figura 24).

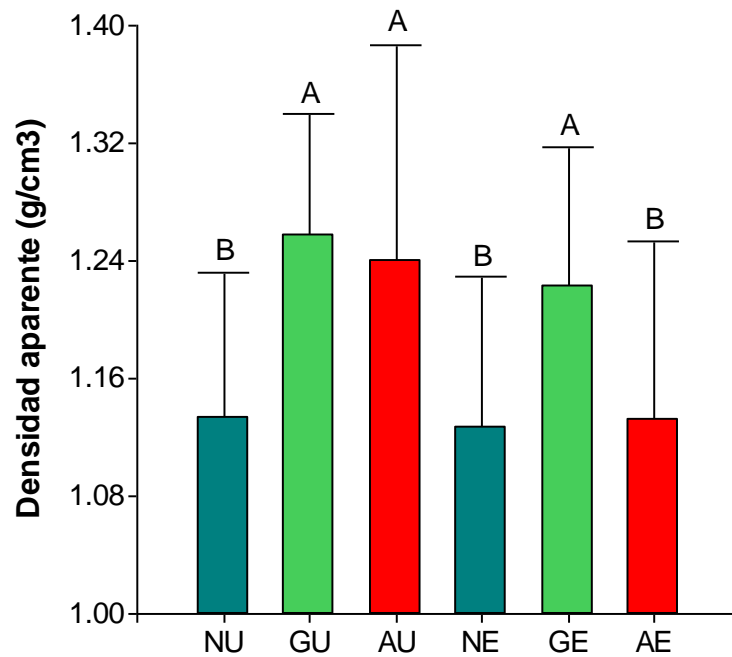


Figura 24. Densidad aparente (g/cm^3). Las barras indican la desviación estándar ($n = 30$). Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas ($P < 0.05$).

NU: Pastizal Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Pastizal Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

Por su parte, en los datos correspondientes a la humedad gravimétrica, contenido de materia orgánica, nitrógeno total y la relación C/N, no tuvieron distribución normal ($P < 0.05$), por lo que se realizó el test de Kruskal–Wallis.

El porcentaje de humedad en el suelo (Figura 25) fue mayor en el pastizal naturalizado (30.17%), que difirió significativamente de los otros dos usos estudiados en UNLu ($P < 0.05$). Mientras tanto, en Etchegoyen el contenido de humedad más bajo se registró en el uso ganadero (22.07%) y mostró diferencias significativas con el pastizal naturalizado (28.37%; $P < 0.05$). Mayor contenido de humedad podría tener efectos positivos sobre las comunidades faunísticas y sobre el desarrollo de los cultivos.

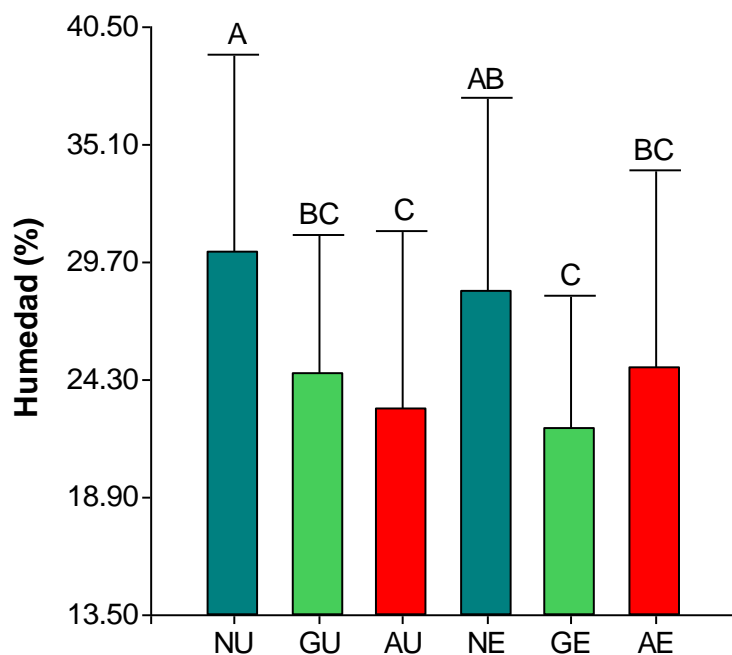


Figura 25. Humedad gravimétrica del suelo (%). Las barras indican la desviación estándar ($n = 30$). Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas ($P < 0.05$).

NU: Pastizal Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Pastizal Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

El contenido de materia orgánica (MO) dio como resultado para todo el muestreo valores entre 4.32 y 5.25% (Figura 26). La MO mostró diferencias significativas entre los usos agrícolas y los pastizales naturalizados ($P < 0.05$) a nivel general, pero no hubo

diferencias significativas en la interacción USO*SITIO ($P = 0.1185$). La disminución de la MO en los primeros centímetros del suelo en sitios agrícolas podría alertar sobre posibles consecuencias negativas, si se tiene en cuenta que la acumulación de la MO favorece el desarrollo de la biota edáfica y mejora las propiedades físicas y químicas del suelo, incrementando la productividad vegetal.

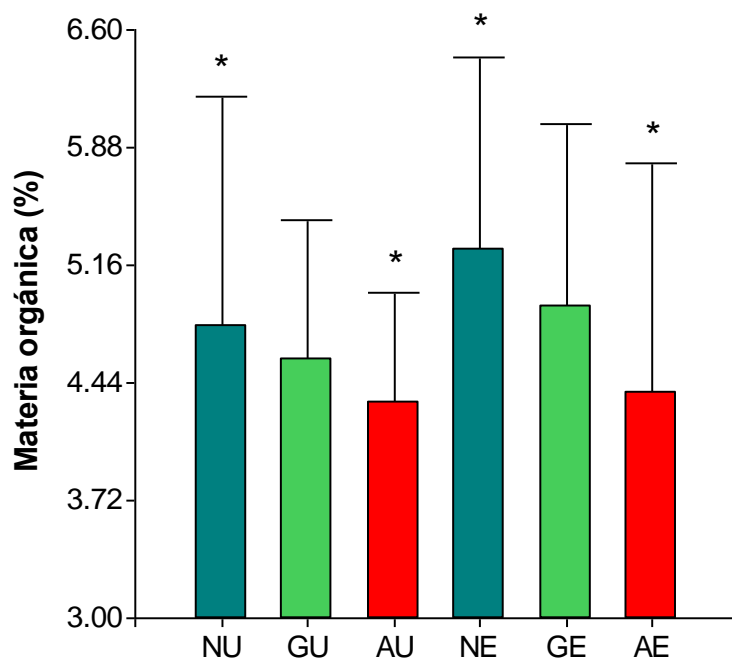


Figura 26. Contenido de materia orgánica del suelo (%). Las barras indican la desviación estándar ($n= 30$). * indica diferencias significativas entre usos a nivel general ($P < 0.05$).

NU: Pastizal Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Pastizal Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

En cuanto al contenido de nitrógeno total en el suelo, los valores estuvieron en el rango de 0.27 y 0.34% (Figura 27). Este parámetro, contrario a lo sucedido con el porcentaje de MO, resultó significativamente mayor en los usos agrícolas de ambos sitios, UNLu y Etchegoyen, que en las muestras de otros usos y coberturas (ganadero y pastizal naturalizado; $P = 0.0004$). Estas diferencias se podrían explicar por la aplicación de fertilizantes ricos en este elemento, necesarios para mantener la producción constante de los cultivos anuales.

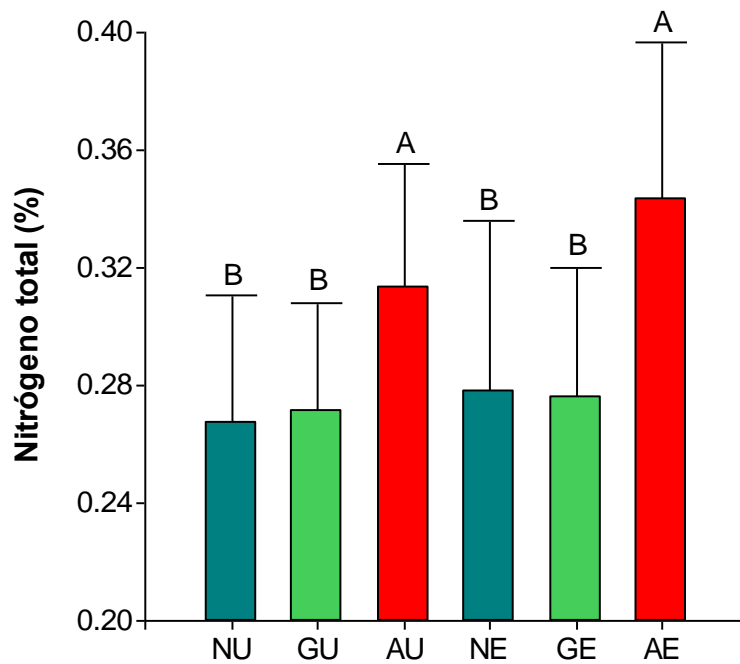


Figura 27. Nitrógeno total del suelo (%). Las barras indican la desviación estándar ($n=30$). Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas ($P < 0.05$).
 NU: Pastizal Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Pastizal Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

La relación C/N se utiliza como indicador de la susceptibilidad de la materia orgánica a ser degradada. La relación C/N estimada en todos los usos estuvo por debajo de 25, lo que advertiría que los nutrientes en el suelo serían rápidamente liberados (Coleman *et al.*, 2004). El menor valor se registró en el lote agrícola de Etchegoyen (8.57) y mostró diferencias significativas con el naturalizado y ganadero del mismo sitio, que registraron 12.35 y 10.48, respectivamente ($P < 0.05$). Entretanto, la relación C/N no mostró diferencias entre usos en el campo experimental de la UNLu (Figura 28).

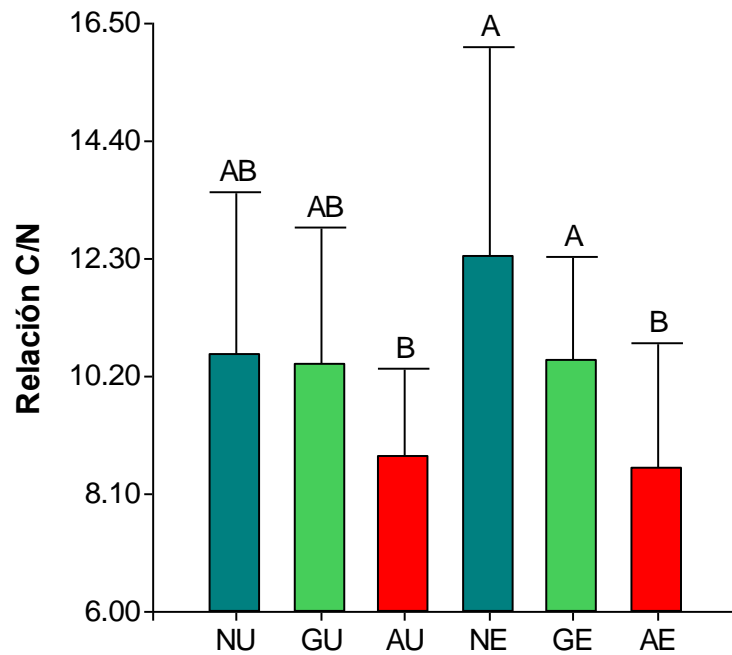


Figura 28. Relación carbono/nitrógeno del suelo. Las barras indican la desviación estándar ($n=30$). Letras distintas indican diferencias significativas entre sistemas ($P < 0.05$).

NU: Pastizal Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Pastizal Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

Se realizó el análisis de componentes principales para evaluar el ordenamiento de los sistemas de acuerdo con las propiedades físicas y químicas del suelo. El primer componente del análisis explicó el 56.8% de la variabilidad y claramente separó a los sistemas naturalizados de los usos agrícolas y ganaderos. Se observó una fuerte asociación de los sistemas naturalizados de ambos sitios (UNLu y Etchegoyen) con mayores valores de materia orgánica y humedad del suelo. El segundo componente explicó el 32.8% de la variabilidad y separó a los usos ganaderos, caracterizados por mayor compactación, de los usos agrícolas asociados con el porcentaje de nitrógeno total en el suelo, especialmente el uso agrícola de Etchegoyen (Figura 29).

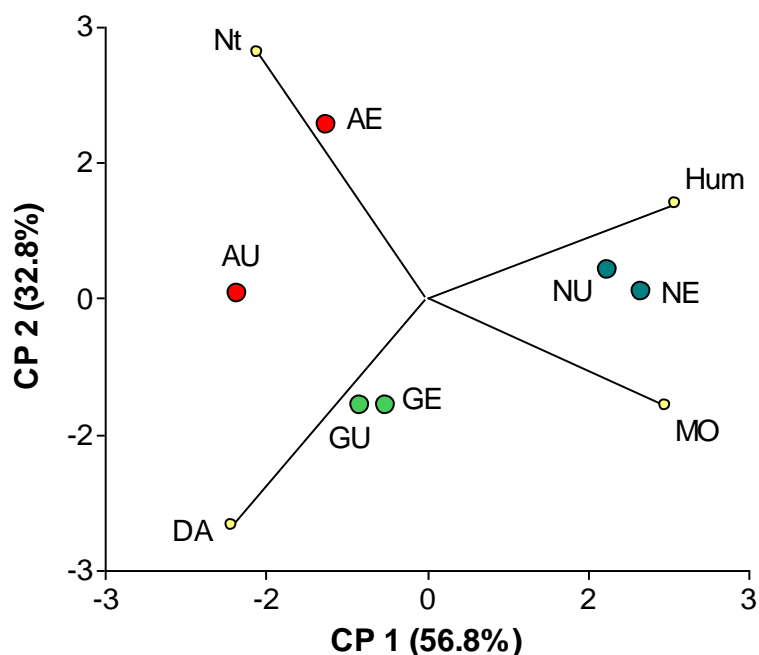


Figura 29. Proyección de los sistemas en el plano factorial de los dos primeros componentes principales para las propiedades físicas y químicas del suelo.

Hum: Humedad gravimétrica; DA: Densidad aparente; MO: Materia orgánica; Nt: Nitrógeno total.

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

Estos resultados apoyan la idea de que el uso del suelo con fines productivos afecta negativamente su calidad física y química, si se compara con los sistemas de referencia. Estos efectos fueron desfavorables específicamente sobre el contenido de materia orgánica y de humedad en suelos con agricultura convencional; mientras que en los suelos con uso ganadero, la densidad aparente, propiedad relacionada con la compactación, y la humedad del suelo se vieron también alteradas. Por su parte, el contenido de nitrógeno fue significativamente mayor en lotes con uso agrícola, lo que se podría relacionar con las prácticas de fertilización (ver detalle en la sección Materiales y Métodos), donde este nutriente es uno de los principales componentes de los insumos utilizados para el sostenimiento de los cultivos, el mantenimiento de los nutrientes en el suelo y para incrementar la producción.

4.2.3 Relaciones entre la comunidad de artrópodos y los atributos del suelo

Se exploraron las asociaciones entre los atributos físicos y químicos del suelo y la densidad de cada uno de los grupos de macro y microartrópodos edáficos, mediante el análisis de correlación canónica (ACC). Se presentan los resultados correspondientes a los casos estadísticamente significativos al nivel $\alpha = 0.10$ (Figura 30). El ACC mostró correlación significativa entre las variables físicas y químicas y la densidad de grupos taxonómicos ($\chi^2 = 111.92$; $R_{\text{canónico}} = 0.5912$; $P = 0.0586$).

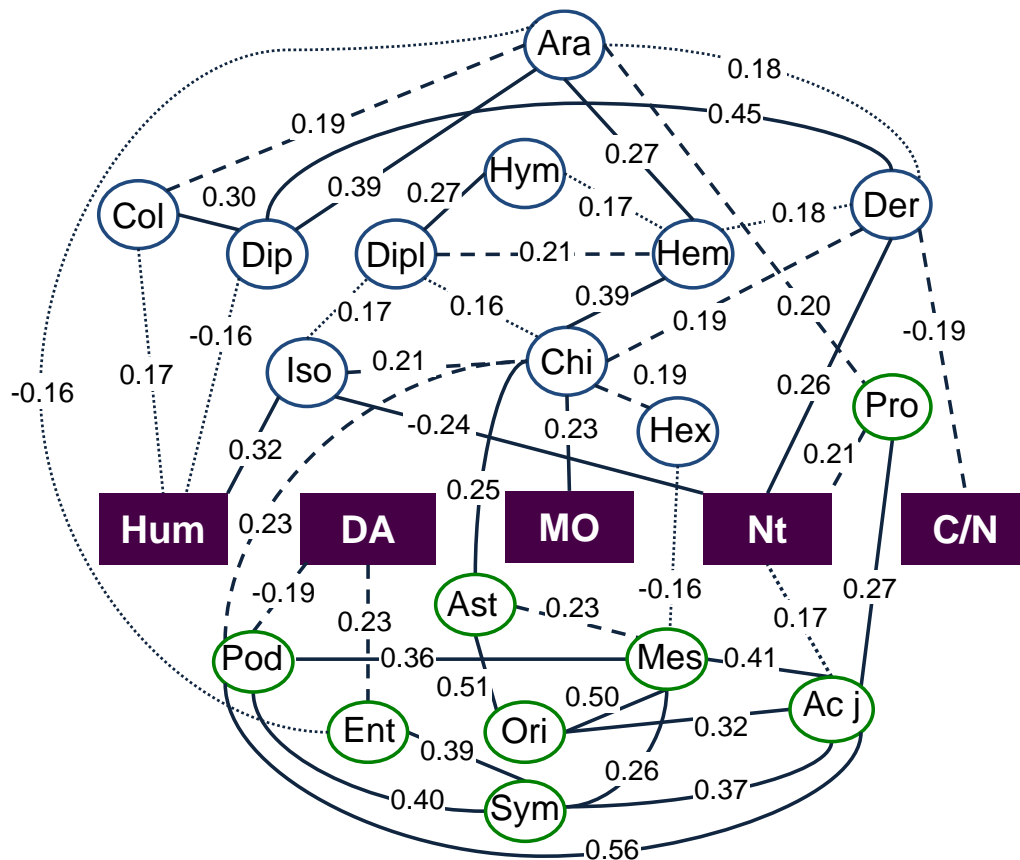


Figura 30. Correlación Canónica entre variables físicas y químicas y la densidad de grupos taxonómicos. Hum: Humedad gravimétrica; DA: Densidad aparente; MO: Materia orgánica; Nt: Nitrógeno total; C/N: Relación carbono/nitrógeno. Ara: Araneae; Chi: Chilopoda; Dipl: Diplopoda; Col: Coleoptera; Der: Dermaptera; Dip: Diptera; Hem: Hemiptera; Hym: Hymenoptera; Hex: Hexapoda inmaduros; Iso: Isopoda; Ori: Oribatida; Ast: Astigmata; Pro: Prostigmata; Mes: Mesostigmata; Ac j: Acari juveniles; Pod: Poduromorpha; Ent: Entomobryomorpha; Sym: Symphypleona. Valores indican el coeficiente de correlación. Correlación significativa: ——— $P < 0.01$; - - - - $P < 0.05$; $P < 0.10$.

La estructura de los factores mostró que la humedad y el contenido de nitrógeno total fueron las variables edáficas que mejor explicaron la distribución de los artrópodos del suelo. Se destaca la relevancia del contenido de humedad en condicionar la densidad y actividad de los isópodos ($r = 0.31$; $P = 0.0008$) y, en menor medida, la de los coleópteros ($r = 0.17$; $P = 0.0833$) y dípteros, con los que tuvo relación inversa ($r = -0.16$; $P = 0.0974$). La densidad aparente se correspondió con la presencia de colémbolos Entomobryomorpha y mostró relación negativa con los Poduromorpha, mientras que los diplopodos y quilópodos aparecieron asociados positivamente entre sí y con la materia orgánica. Dermaptera y ácaros Prostigmata y juveniles estuvieron asociados positivamente con el contenido de nitrógeno total, propiedad que se correlacionó negativamente con los isópodos. El análisis también mostró la asociación negativa entre la relación C/N y los dermaptera ($r = -0.19$; $P = 0.0455$). Las correlaciones, por supuesto, son sólo indicativas y no representan relaciones causales, aunque las podrían sugerir.

El análisis de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales (Figura 31) explicó el 57.4% de la inercia total (varianza ponderada). Las covariables de mayor inercia sobre el factor 1 fueron nitrógeno total, la relación C/N y el contenido de humedad, aunque las interacciones detectadas en este conjunto de datos, desde las características del suelo, se pueden atribuir principalmente a estas últimas dos propiedades. Valores de humedad y relación C/N relativamente altos se registraron en el sistema naturalizado de la UNLu, lo que podría explicar las altas densidades de isópodos y coleópteros en esta cobertura, respecto a los otros usos. Las características del suelo relacionadas con la MO, parecieran ser importantes para explicar las interacciones entre organismos detritívoros como diplópodos, ácaros Oribatida y Astigmata y colémbolos Poduromorpha, más abundantes en el pastizal naturalizado de Etchegoyen.

La segunda dimensión del gráfico se asoció con la mayor compactación (densidad aparente), reconocida en el uso ganadero de la UNLu y que mostró relación con mayor densidad de organismos como arañas y colémbolos de los órdenes Symphypleona y Entomobryomorpha, más asociados con hábitats superficiales, por lo que la vegetación más baja y menos densa les permitiría mayor facilidad de desplazamiento.

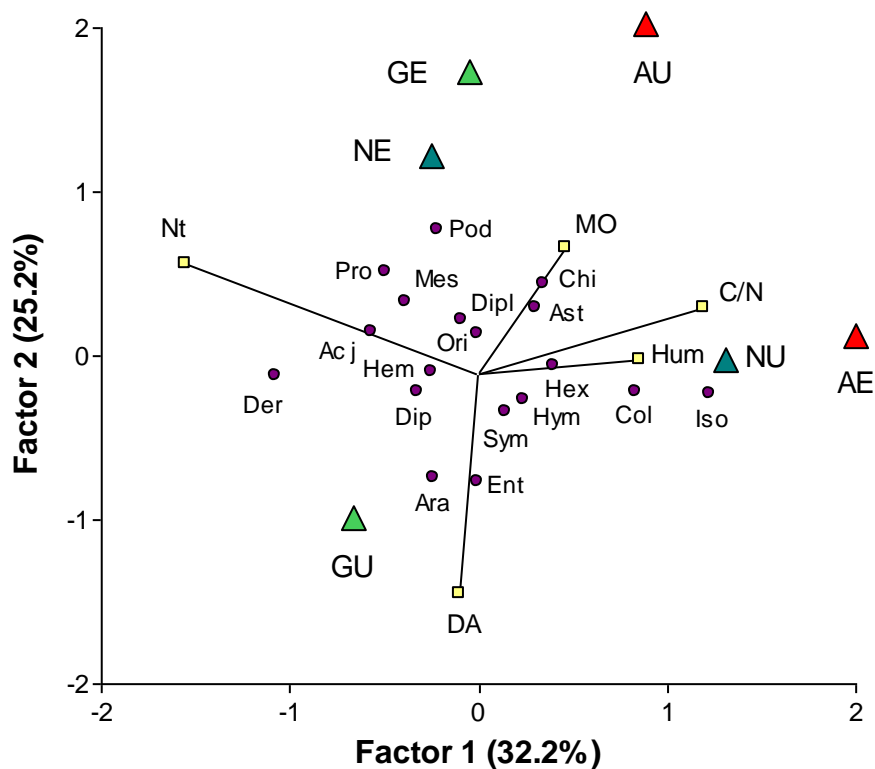


Figura 31. Gráfico de la correlación entre la matriz de interacción entre 18 grupos faunísticos y 6 ambientes versus la matriz de 5 covariables ambientales.

Ara: Araneae; Chi: Chilopoda; Dipl: Diplopoda; Col: Coleoptera; Der: Dermaptera; Dip: Diptera; Hem: Hemiptera; Hym: Hymenoptera; Hex: Hexapoda inmaduros; Iso: Isopoda; Ori: Oribatida; Ast: Astigmata; Pro: Prostigmata; Mes: Mesostigmata; Ac j: Acari juveniles; Pod: Poduromorpha; Ent: Entomobryomorpha; Sym: Symphypleona.

Hum: Humedad gravimétrica; DA: Densidad aparente; MO: Materia orgánica; Nt: Nitrógeno total; C/N: Relación carbono/nitrógeno.

NU: Naturalizado UNLu; GU: Ganadero UNLu; AU: Agrícola UNLu; NE: Naturalizado Etchegoyen; GE: Ganadero Etchegoyen; AE: Agrícola Etchegoyen.

En síntesis, la comunidad de macroartrópodos difiere según el uso con abundancias totales y variedad de taxones mayores en los sistemas naturalizados y menores en los usos agrícolas. La abundancia y variedad de la mesofauna (microartrópodos) no mostró un patrón claro de variación con respecto a los usos. Los suelos de pastizal naturalizado mostraron valores mayores de humedad y materia orgánica y densidades aparentes menores; los lotes agrícolas mostraron mayores valores de nitrógeno.

Capítulo 5

Discusión y Conclusiones

Los suelos son sistemas ecológicos complejos con una rica comunidad de organismos que sostienen una gran variedad de funciones y servicios ecosistémicos. La historia de un suelo puede leerse tanto en sus propiedades físicas y químicas como en la estructura de las comunidades que lo habitan. Los cambios en el uso del suelo, en particular las actividades productivas con sustitución de las coberturas vegetales naturales para establecer sistemas intensivos, trae como consecuencias el deterioro del suelo, la lixiviación y agotamiento de nutrientes, la disminución de la capacidad productiva de los agroecosistemas y la reducción de la biodiversidad y sus funciones (Barrios, 2007).

El uso sostenido de un sistema de producción se reflejará en modificaciones de propiedades edáficas básicas como la densidad aparente, la capacidad de retención de humedad, la materia orgánica o la estructura. A su vez, la diversidad, el número de grupos y funciones de los invertebrados del suelo son sensibles al estrés y al cambio ambiental, asociados con la labranza, la aplicación de fertilizantes y plaguicidas, talas y otras prácticas de cultivo que impactan a las comunidades del suelo, alteran las entradas de materia orgánica y modifican el hábitat (Bedano *et al.* 2006a; 2006b). Como los diferentes niveles de organización del sistema se ven afectados de manera diferente pero predecible por las actividades productivas y por el estado funcional del recurso, es posible usar cada uno de esos niveles de organización (el medio físico, las comunidades, las poblaciones) como indicadores del grado de deterioro o del estado ecológico de un suelo (Figura 32). Por otra parte, cada nivel de organización reflejará cambios a diferentes escalas espaciales y temporales, de manera que se pueden desarrollar indicadores combinados que integren la información de varios de ellos.

En el trabajo desarrollado en esta tesis, se ha demostrado que lotes con dos usos diferentes (ganadero y agrícola), comparados con lotes del mismo suelo con pastizales naturalizados, presentan cambios en las propiedades físicas y químicas, en la estructura de las comunidades de artrópodos y en la variabilidad genética de una especie elegida como modelo biológico. En particular, se hizo énfasis en este último aspecto teniendo en cuenta que la variabilidad y la estructura genética de una especie pueden dar cuenta de procesos de diferente alcance histórico o temporal.

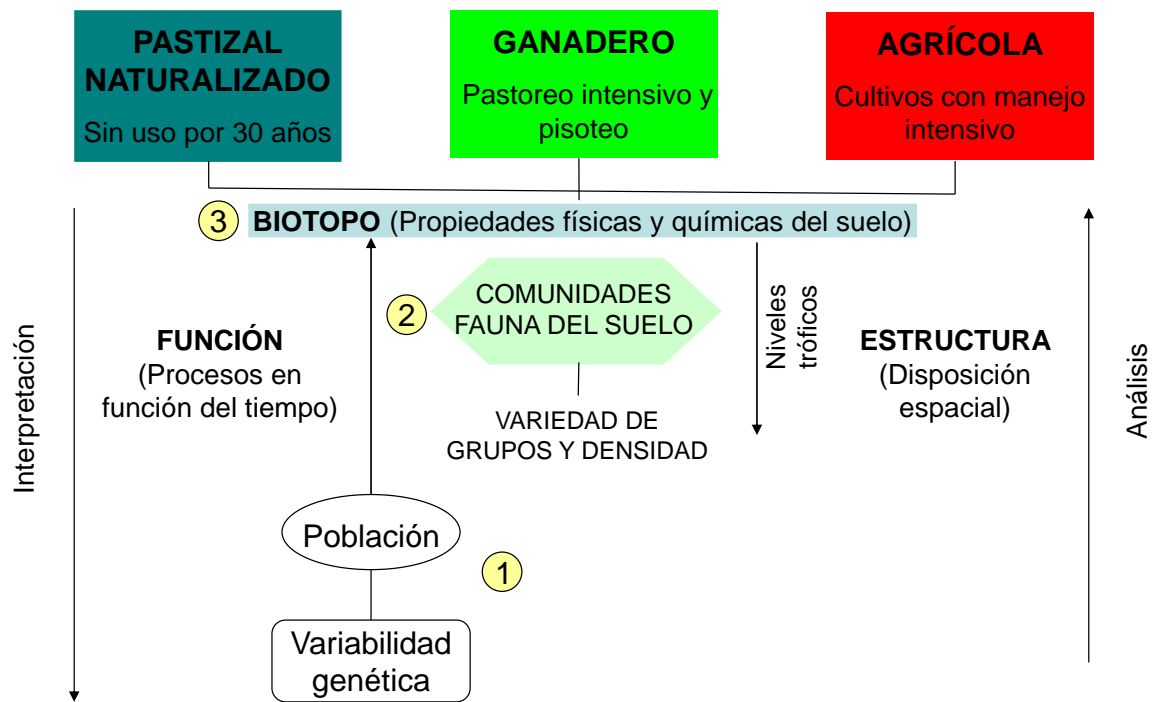


Figura 32. Niveles de organización analizados en el trabajo de tesis.

La escala espacial para el análisis fue el lote, afectado por las prácticas agrícolas locales (especies cultivadas, aplicación de insumos, labranza, pastoreo, pisoteo, entre otros).

Definición de caracteres estructurales y funcionales: La *estructura* se refiere a la disposición espacial de los componentes en el sistema en un momento dado (individuos de cada grupo taxonómico, densidad, biomasa, redes de comunicación que permiten el intercambio de materia, energía e información), expresados en cantidad por unidad de espacio. Mientras tanto, la *función* se relaciona con los flujos de energía, expresados en cantidad por unidad de tiempo.

1) **Población:** Conjunto de individuos de la misma especie que viven en el mismo lugar, en el mismo tiempo, y que tienen la capacidad de reproducirse.

Variabilidad genética como reflejo del proceso de reorganización de la población, en respuesta al cambio continuo que sufren los agroecosistemas. Variabilidad genética y estructura poblacional de *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea). Mayor escala temporal y espacial.

2) **Número de grupos taxonómicos de alto rango:** Estimación a partir de muestras que representan a las comunidades de macro y microartrópodos en cada sistema. Escala temporal reciente.

3) **BIOTOPO:** Evaluación de las propiedades físicas y químicas del suelo que puedan condicionar la actividad biológica. Escala temporal reciente.

En esta tesis se analizaron la diversidad y la estructura genética poblacional de *Armadillidium vulgare*, el “bicho bolita”, en dos campos del partido de Luján con diferentes usos del suelo, utilizando marcadores moleculares ISSRs. La diversidad genética está afectada por eventos demográficos históricos y contemporáneos. Las distintas combinaciones de valores altos y bajos de la diversidad pueden ser indicativos de características de la historia de vida de las poblaciones. Elevados valores en la diversidad pueden ser atribuibles a un contacto secundario entre linajes alopatricos previamente diferenciados, o bien a una gran población estable con una larga historia evolutiva (Grant & Bowen, 1998). La elevada diversidad permite suponer un tamaño poblacional efectivo considerable, y en poblaciones de tamaño efectivo pequeño, la variabilidad suele ser muy baja (Avice *et al.*, 1984).

El análisis de los marcadores moleculares ISSRs mostró una variación genética considerable, evaluada a través del porcentaje de *loci* polimórficos, el número de bandas, la diversidad genética (h) y el índice de información de Shannon (I), que, en los usos agrícolas en ambos campos (UNLu y Etchegoyen) fueron menores respecto a los otros dos usos, de acuerdo con lo esperado. El bajo pero significativo nivel de variación genética detectado en los usos agrícolas podría indicar que estos grupos pertenecen a poblaciones de menor tamaño, sometidas a un régimen de mayor perturbación causado por la intensificación de las prácticas productivas, sostenidas por largos periodos de tiempo, lo que podría aumentar la importancia de la deriva genética; o a que los grupos se corresponden con áreas colonizadas más recientemente (Hartl & Clark, 2007).

La información sobre de las distancias genéticas entre individuos obtenida se utilizó para un análisis multivariado de coordenadas principales, que arrojó un primer nivel de agrupamiento de los individuos que coincide con los diferentes usos del suelo. En ambos campos los individuos del uso agrícola se superponen principalmente con una parte del ganadero, pero se diferencian bien de los del pastizal naturalizado; no obstante, en Etchegoyen los puntos presentan mayor dispersión y hay mayor superposición de usos. Esto indicaría que en este campo (Etchegoyen), el grado de impacto de ambos usos es similar si se compara con el lote sin disturbar. Mientras tanto en UNLu, esto puede deberse a que la historia de uso es más antigua, su punto de partida (suelo no disturbado) es de mayor calidad que en Etchegoyen y, además, los usos ganadero y agrícola se van rotando entre sí, con lo cual sus efectos convergen.

Dado el nivel de movilidad de la especie estudiada, es posible que cuando las poblaciones se ven disminuidas por las perturbaciones ligadas a la actividad productiva, se produzcan procesos de recolonización y se establezca una dinámica metapoblacional. Cuando se analizan las distancias genéticas utilizando el método de vecino más cercano (árbol sin raíz unido por NJ), aparecen agrupamientos fragmentados, especialmente en los usos más intensivos en Etchegoyen (donde los individuos del pastizal naturalizado permanecen casi todos en una misma raíz). En UNLu, aparecen subgrupos en todos los usos aunque la división es más marcada en los del uso intensivo (el naturalizado se subdivide sólo en dos ramas). Esta información apoya la idea de un efecto de tipo metapoblacional, ya que los subgrupos observados se podrían asociar con individuos colectados en diferentes años de muestreo. Dado que *A. vulgare* tiene una reproducción de ciclo anual y se mueve activamente en busca de hábitats favorables, diferentes grupos, genéticamente individualizables, podrían estar recolonizando los lotes cada año desde parches vecinos. Este efecto sería más marcado en los usos con mayor perturbación.

Bajo el modelo de “aislamiento por distancia” (Wright, 1943; Slatkin, 1987), se espera un continuo incremento de la distancia genética entre poblaciones en función de un incremento en la distancia geográfica. La estructura genética poblacional es entonces el resultado de la deriva genética y de la dispersión (Wright, 1951). El modelo de aislamiento por distancia examina la relación del flujo génico entre pares de poblaciones y se relaciona con el hecho de que la diferenciación genética se incrementa a mayor distancia. En este caso, se puede ver que para la prueba de Mantel la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, aunque arroja una relación débil (de baja pendiente y mucha dispersión), es significativa, lo cual indicaría que las distancias entre usos están en el rango de dispersión de la especie, aunque existe evidencia de aislamiento por la distancia.

Si en lugar de procesar los resultados en función del agrupamiento de individuos, se concentra la atención en la diferenciación genética medida a través del coeficiente F_{ST} , se observa que, tomando cada campo en su conjunto, independientemente del uso, existe mayor grado de diferenciación genética en UNLu que en Etchegoyen. Si se comparan los usos, con el análisis molecular de la varianza (AMOVA) se demuestra que la divergencia entre usos es mayor para UNLu que para Etchegoyen: en UNLu, el AMOVA indicó que hubo baja pero significativa diferenciación genética entre los usos ($\Phi_{PT} = 0.101$; $P = 0.001$), con el 90% de la variabilidad genética global dentro de los usos y el 10% de la variación entre usos; en

Etchegoyen por su parte, el AMOVA sugirió menor diferenciación genética entre usos ($\Phi_{PT} = 0.082$; $P = 0.001$), con tan sólo el 8% de diferenciación entre usos y el 92% restante correspondió a la variabilidad genética global dentro de los usos.

El patrón de diferencias no es igual para los dos campos ya que la divergencia entre usos fue mayor entre el pastizal y el agrícola en UNLu ($\Phi_{PT} = 0.128$) y entre el pastizal y el ganadero en Etchegoyen ($\Phi_{PT} = 0.099$). La significativa diferenciación genética entre los grupos de UNLu, específicamente entre los asentados en los usos agrícola y naturalizado que están separados por 950 m, podría sugerir la importancia de los cuellos de botella en este campo (Sesarini & Remis, 2008) o los efectos combinados de la deriva genética y la migración. Entretanto, la diferenciación genética más baja entre los usos de Etchegoyen y entre los usos agrícola y ganadero de UNLu, se puede atribuir a los polimorfismos ancestrales compartidos o a que existe mayor flujo génico entre los grupos, beneficiado por la menor distancia geográfica entre ellos (menor de 350 m).

El análisis bayesiano usando el programa Hickory confirmó la existencia de diferenciación genética explicada anteriormente, ya que arrojó valores de θ^{II} y del coeficiente f diferentes de cero, lo cual indica la existencia de diferenciación genética y cierto grado de endogamia. Cuando se realiza la comparación entre usos por pares dentro de cada campo, en UNLu no parece haber sorpresas: el sistema naturalizado tiene un grado de diferenciación bastante mayor que los otros dos usos y se distancia más del uso agrícola, de perturbación mayor. En cambio en Etchegoyen, las diferencias son menores y, además, el uso con mayor diferenciación del naturalizado, es el ganadero en vez del agrícola.

Otro de los aspectos analizados es el grado de estructuración genética dentro de las poblaciones, el cual se analizó mediante el software STRUCTURE. Se pudo observar que, efectivamente, el campo de Luján soporta mayor diversidad de grupos genéticos (siete) que son más específicos del uso; para el pastizal naturalizado tres grupos exclusivos, para los usos agrícola y ganadero un grupo exclusivo en cada uno y dos compartidos. En cambio para Etchegoyen hay sólo dos grupos y son compartidos entre los tres usos aunque presentan diferente proporción. O sea que, en términos generales, UNLu es un ambiente con mayor variabilidad genética total. Esta mayor variabilidad puede estar relacionada con el efecto causado por una mayor heterogeneidad espacial, a su vez percibida de manera específica por

los grupos, y también por el tiempo de uso del suelo en cada campo, el cual ha sido mayor en UNLu que en Etchegoyen.

El mayor número de grupos exclusivos en el pastizal naturalizado de UNLu podría deberse a su mayor distancia geográfica con los dos lotes bajo manejo agrícola y ganadero que son adyacentes y que, coherentemente, comparten grupos. La homogeneidad observada en Etchegoyen se podría explicar de dos maneras; por un lado, a un aislamiento más reciente (Hoelzel, 1998), y por otro, por un alto flujo genético entre los grupos (Shaklee & Samollow, 1984) favorecido por la cercanía entre los usos.

Armadillidium vulgare se podría considerar una "especie indicadora" (Paoletti & Hassall, 1999) para el estudio del impacto del cambio en los usos del suelo sobre la fauna edáfica, ya que el nivel de polimorfismo muestra que depende de muchos factores, incluyendo los bióticos. Sin embargo, *A. vulgare* parece ser muy variable a nivel molecular. En un estudio llevado a cabo en Europa y América del Norte usando enzimas, Garthwaite *et al.* (1995) informaron alto nivel de variabilidad genética de *A. vulgare* dentro y entre las poblaciones, sobre todo en Europa. Resultados similares se encontraron en escalas espaciales más pequeñas, utilizando los marcadores genéticos de ADN mitocondrial (Rigoud *et al.*, 1999) y RAPD (Homor *et al.*, 2003). Otras evidencias se proporcionan para el enorme listado del efecto perjudicial de la actividad humana sobre las poblaciones naturales. La región Pampeana Argentina no es una excepción; más de 40 años de actividad agrícola y ganadera intensiva pueden aislar a las poblaciones de los pastizales naturales en una escala espacial más pequeña. La explicación basada en el aislamiento de poblaciones es sólo una posibilidad. Muchos procesos en segundo plano pueden explicar las diferencias en la composición genética de las poblaciones. Los marcadores genéticos son útiles para proporcionar altos niveles de polimorfismo pero, por lo general, los procesos de fondo se mantienen inciertos.

Complementariamente, en esta tesis se analizó la estructura de la comunidad de artrópodos edáficos como otro nivel de organización, teniendo en cuenta que la conversión de tierras a agrosistemas y la intensificación de las prácticas agrícolas afectan directa o indirectamente los servicios ecosistémicos que involucran a distintos grupos de artrópodos terrestres: el control de plagas que engloba a depredadores y parasitoides; el reciclaje de nutrientes en el suelo mediado por los detritívoros; y la polinización de cultivos que realizan

los insectos antófilos (Gonthier *et al.*, 2014). Por lo tanto, la estructura y funcionalidad de un agroecosistema se pueden medir a través de la biodiversidad de artrópodos benéficos, y en tal sentido se ha desarrollado un volumen importante de investigación sobre los efectos que pueden tener el labrado del suelo, el uso de fertilizantes, la configuración de cercos vivos, la rotación de cultivos y el uso de plaguicidas en la abundancia y riqueza de diferentes grupos de artrópodos (Paoletti *et al.*, 2007; Gonthier *et al.*, 2014).

Los sistemas naturalizados albergan una gran diversidad biótica, sustentada principalmente por la arquitectura compleja (diferentes estratos vegetales) y por la acumulación de hojarasca en el suelo y sus distintos estados de descomposición. En sistemas manejados, las diferentes prácticas agropecuarias provocan cambios en la complejidad estructural, que pueden desembocar en distintos estados alternativos que promueven o reducen la biodiversidad. Ambos son procesos estudiados en reiteradas oportunidades a través de las comunidades de artrópodos y basándose en ellas, varios taxones han sido propuestos como potenciales indicadores (Giraldo Mendoza, 2014).

Los resultados de esta tesis muestran que la intensidad de uso del suelo afecta la riqueza y densidad de varios grupos de macro y microartrópodos. Por ejemplo, en el campo de la UNLu los diplópodos sólo se hallan presentes en el sistema naturalizado; los isópodos son significativamente más abundantes en dichos sistemas que en los ganaderos y se minimizan en los sistemas agrícolas, y los quilópodos, himenópteros y hemípteros son significativamente más abundantes en sitios naturalizados que en suelos con los otros dos usos. La disminución de los isópodos y diplópodos en lotes ganaderos y agrícolas se puede explicar por la escasez comparativa de hojarasca, teniendo en cuenta que son organismos principalmente detritívoros (David & Handa, 2010; Diekötter *et al.*, 2010); por las diferencias en la calidad de los restos vegetales y detritos, y la distribución vertical de los recursos en los pastizales y en los lotes cultivados; y, por su particular dependencia de las condiciones de humedad del suelo o de la superficie, encontrándose asociados con ambientes húmedos (Warburg *et al.*, 1984; Dindal, 1990) y la oferta de refugios superficiales (Coleman *et al.*, 2004; David & Handa, 2010). En el caso de los quilópodos que son depredadores, la mayor disponibilidad de presas y de refugios en los sitios naturalizados podrían explicar los resultados obtenidos (Callaham *et al.*, 2006; Moço *et al.*, 2010). Esto, basados en la idea de que los efectos del incremento en los recursos de base pueden transferirse hacia los niveles

tróficos superiores (Cole *et al.*, 2005), generando también aumentos en la densidad de especies tróficas superiores en función de la disponibilidad de presas.

En general, la práctica de pulverización con diferentes productos usada para combatir a los artrópodos considerados plaga, podría ayudar a explicar que los lotes con uso agrícola intensivo mostraran menor número de grupos de macroartrópodos y menor densidad total, respecto a los sistemas de referencia. Se considera que la cuantificación de las variaciones poblacionales de diferentes grupos taxonómicos constituye una herramienta para la evaluación de los impactos generados por la perturbación del ambiente edáfico sobre diferentes comunidades de la fauna del suelo.

Por otra parte, se ha demostrado que la densidad total de ácaros disminuye cuando el suelo está cultivado (Bedano *et al.*, 2006a), y se ha destacado la importancia del microclima y de la heterogeneidad del hábitat sobre la abundancia y diversidad de especies de Acari (Arolfo *et al.*, 2010). En el campo Etchegoyen, la densidad total de ácaros coincide con la tendencia a disminuir en el lote agrícola si se compara con el sistema naturalizado; mientras que en UNLu la abundancia de ácaros no mostró diferencias entre usos. Sin embargo, los distintos grupos de ácaros parecieran responder de diferente manera a las perturbaciones relacionadas con los cultivos. Por ejemplo, se ha señalado que ciertos grupos pueden incrementar su abundancia en suelos agrícolas y ganaderos, como es el caso de Astigmata y Prostigmata; y que las comunidades de oribátidos son particularmente vulnerables a las perturbaciones, ya que tienen escasa capacidad para responder numéricamente a alteraciones ambientales en el corto plazo (Bedano *et al.*, 2011). En esta tesis se encontró que en los lotes naturalizados, los oribátidos fueron más abundantes, mientras que en los lotes con manejo agrícola fueron más abundantes los prostigmatas en el campo de Etchegoyen, y astigmatas en el de la UNLu.

En esta tesis, los resultados de la densidad total de colémbolos al nivel de resolución taxonómica usado no mostraron un patrón de acuerdo con lo esperado, que fuera significativamente menor en los lotes con manejo agrícola intensivo, de acuerdo con lo reportado por Petersen (2002), que encontró que la densidad de colémbolos para varios campos cultivados fue generalmente baja, comparada con los datos de sitios naturales y seminaturales.

No obstante, los colémbolos son conocidos por vivir en un amplio rango de condiciones del suelo y son numéricamente importantes en los agroecosistemas (Palacios-Vargas, 2014). Endlweber *et al.* (2006) encontraron que la densidad de colémbolos epigeos se redujo al incrementar el uso de insecticidas en el suelo y de aplicación foliar, mientras que los grupos de colémbolos endógeos permanecieron poco afectados. Empero, argumentaron que esta variación depende de la sensibilidad de cada especie, de la dosis aplicada y del tiempo de exposición. Maraun *et al.* (2003) sugirieron que los colémbolos son sensibles a la perturbación mecánica, aún más que los ácaros oribátidos. Sin embargo, ellos señalaron que se han registrado en campos de alfalfa, valores de densidad similares a los de sitios naturales. También se ha sugerido que los colémbolos pueden tener poblaciones numerosas bajo manejo muy intensivo, tal y como sucedió en este trabajo, donde en el lote agrícola de la UNLu, la densidad total de colémbolos fue significativamente superior, respecto a los demás usos.

Los resultados de esta tesis mostraron que la densidad de microartrópodos se vio afectada negativamente en los sistemas ganaderos de ambos campos, mostrando de algún modo el efecto del pisoteo sobre la estabilidad estructural del suelo, corroborado por el aumento significativo de la densidad aparente en estos lotes, que disminuye los espacios porosos disponibles para los microartrópodos y que es uno de los factores determinantes de la abundancia (Winter *et al.*, 1990). En cuanto a la riqueza, también fue evidente el mayor número de grupos en las pasturas naturalizadas que en los suelos cultivados y cambios en las abundancias relativas de algunos grupos, como se ha demostrado en otros trabajos (Winter *et al.*, 1990; Joy *et al.*, 2005; Endlweber *et al.*, 2006; Frampton & van den Brink, 2007).

En cuanto a las variables físicas y químicas del suelo, evaluadas como parte del medio físico o biotopo, la mayoría mostraron diferencias significativas entre usos dentro de cada campo, con excepción del porcentaje de materia orgánica. El incremento en la densidad aparente en el uso ganadero probablemente se deba al efecto del pisoteo del ganado, mientras que su disminución en el uso agrícola de Etchegoyen puede ser debida al laboreo. La densidad aparente se utiliza como parámetro para estimar el grado de deterioro físico del suelo, teniendo en cuenta que a medida que aumenta su valor, se está produciendo una degradación de la estructura del mismo, bien sea por compactación o por pérdida de materia orgánica (Gal *et al.*, 2007). El impacto causado por el pisoteo animal sobre el suelo ocasiona

la disminución de la porosidad del suelo por compactación y puede provocar la disminución del espesor de horizontes superficiales. El pisoteo también aumenta los procesos de erosión al disminuir la fuerza mecánica que agrega las partículas. En caso de existir un horizonte orgánico bien desarrollado, éste atenúa el impacto sobre los horizontes minerales inferiores.

La humedad gravimétrica fue estadísticamente mayor en el sistema naturalizado de la UNLu y mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) con los sistemas agrícolas y ganaderos de ambos sitios, UNLu y Etchegoyen. Estas diferencias entre sistemas se podrían explicar por las diferencias en la cobertura vegetal, ya que en sitios naturalizados la presencia de vegetación nativa de diferentes estratos disminuye los efectos de la temperatura y previene y/o minimiza las pérdidas de humedad del suelo, de acuerdo con lo expuesto por Coleman *et al.* (2004).

Por su parte, la materia orgánica, variable que se usa con mayor frecuencia como indicador de la calidad del suelo, no necesariamente está asociada con un mejor estado del sistema (Galantini & Suñer, 2008); en particular, en los lotes evaluados en este trabajo, la entrada de materia orgánica es aportada principalmente por la vegetación, siendo un recurso energético rápidamente explotado por los invertebrados edáficos. En el caso de los usos agrícolas, los contenidos de materia orgánica total mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con los pastizales naturalizados, aunque no se sabe qué proporción de la materia orgánica que ingresa estará disponible para los artrópodos. Según Coleman *et al.* (2004), el tipo y calidad de la materia orgánica del suelo condiciona también la disponibilidad de nutrientes para los cultivos.

Del análisis multivariado exploratorio (análisis de componentes principales) se puede extraer valiosa información en cuanto a la relación entre las variables físicas y químicas y la caracterización de los usos. Como ya se mencionó, el diagrama de dispersión muestra que los lotes con uso ganadero se caracterizan por una mayor densidad aparente, mientras que en los naturalizados existe una fuerte asociación con mayores valores de materia orgánica y humedad del suelo. Los usos agrícolas están más asociados con el porcentaje de nitrógeno total en el suelo, especialmente el agrícola de Etchegoyen. Martius *et al.* (2004) registraron contenidos más altos de C y N en los primeros 10 cm del suelo en suelos con uso agrícola, y lo atribuyeron a que la disponibilidad de N regula el crecimiento de las plantas y consecuentemente la fijación del C en el suelo y la biomasa aérea. El alto contenido de N en

suelos con uso agrícola también se puede atribuir a la aplicación de fertilizantes ricos en este elemento, que favorecen el almacenamiento de carbono y aseguran la asimilación del nitrógeno en forma de amonio (NH_4^+), estimulando la producción de biomasa vegetal.

La relación entre la presencia y abundancia de diversos grupos faunísticos del suelo se ha estudiado con diseños similares al aquí realizado y los resultados no son unívocos. Bedano *et al.* (2006a), trabajando con mesofauna edáfica, y particularmente con ácaros, han mostrado que la intensidad del uso del suelo tiene un efecto adverso sobre la densidad de Oribatida, Mesostigmata y la densidad total de ácaros; no obstante, no encuentran siempre las mayores densidades en los campos naturales, sino que, en algunos casos, las densidades más altas se encuentran en campos de ganadería vacuna, algo similar a lo observado con algunos grupos.

Trabajando con la macrofauna, a un nivel de resolución taxonómica similar al de esta tesis, Domínguez *et al.* (2010) encontraron una disminución significativa de arañas, coleópteros y diplópodos en campos con explotación agrícola bajo siembra directa con respecto a los pastizales naturales. En este caso, los autores atribuyen el resultado a una combinación de factores tales como cambios en el pH, la materia orgánica, la compactación y el uso de agroquímicos. Sin embargo, en ese trabajo las relaciones entre abundancias y variables físicas y químicas no son tan claras como el efecto puntual del uso, que también se ve en las diferencias entre las variables físicas y químicas del suelo encontradas en el presente estudio.

Otros autores han trabajado con grupos funcionales de la meso y macrofauna (Moço *et al.*, 2010) y destacan la influencia de las propiedades físicas y químicas del suelo sobre la diversidad de especies (aunque no sobre las densidades totales); según estos autores, el pH, los contenidos de C y N, la cantidad de arcillas, la suma de bases y la densidad aparente son las variables que explican las variaciones que observaron. El impacto antrópico sobre los microartrópodos se asocia con la reducción del espacio habitable, con la consecuente reducción total o parcial de algunos grupos de la comunidad (Fredes *et al.*, 2009).

Los resultados del análisis de correlación canónica y del análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales, muestran que la distribución y abundancia de los macro y microartrópodos en los sistemas evaluados están determinadas por la disponibilidad de

alimento, condiciones de humedad del suelo y refugio (en forma positiva) y por la intensificación agropecuaria (en forma negativa). Los sistemas cultivados tuvieron dominancia de un grupo pequeño de taxones, lo que refleja la simplificación en la estructura, aun cuando las características físicas y químicas del suelo no difieran entre usos (Díaz Porres *et al.*, 2014).

Si bien los sistemas agrícolas de ambos sitios presentaron mayor contenido de nitrógeno y menor compactación respecto a los usos ganaderos, se podría generalizar que los sistemas con uso agropecuario produjeron un deterioro en la calidad física y química del suelo y sobre diversidad genética del “bicho bolita”, respecto a los sistemas naturalizados (Figura 33). Tal impacto también afectó la densidad de Coleoptera, Diplopoda, Oribatida, Astigmata y Poduromorpha; mientras que grupos como Araneae, Symphypleona y Entomobryomorpha fueron menos afectados por la disminución en la calidad del suelo. La mayor complejidad del estrato herbáceo favorecería la abundancia de los grupos criptozoicos mientras que la simplificación de ese estrato y la compactación del suelo favorecerían relativamente a los grupos caminadores de superficie. Adicionalmente, los sistemas naturalizados brindarían también un ambiente sin factores adicionales de estrés.

En lo referente a la diversidad y estructura genética de *A. vulgare*, los resultados muestran que en los lotes agrícolas en ambos campos, la diversidad genética es menor respecto a los otros dos usos de acuerdo con lo esperado; mientras que los valores de θ^H y del coeficiente f son diferentes de cero, lo cual indica la existencia de diferenciación genética entre las poblaciones y cierto grado de endogamia (Figura 33). La diferenciación y la estructura genética de *A. vulgare* difieren en cada campo en particular: en UNLu, la divergencia entre usos es mayor entre el pastizal naturalizado y el agrícola, y se sostienen siete grupos poblacionales (tres específicos del pastizal); mientras que en Etchegoyen hay menor diferenciación genética entre los usos, se comparten dos grupos poblacionales, y las divergencias son mayores entre el pastizal y el ganadero. En ambos campos existe evidencia de aislamiento por la distancia y en este sentido, las distancias genéticas son mayores entre los usos más alejados entre sí. Estas diferencias en los patrones encontrados en Etchegoyen se pueden deber posiblemente a la cercanía entre los lotes que permite mayor flujo génico por un lado, y por el otro, a que el tiempo de uso agrícola y pecuario en este campo es menor, por lo que los grupos no estén diferenciados, y todavía no se perciba el efecto puntual del cambio de uso.

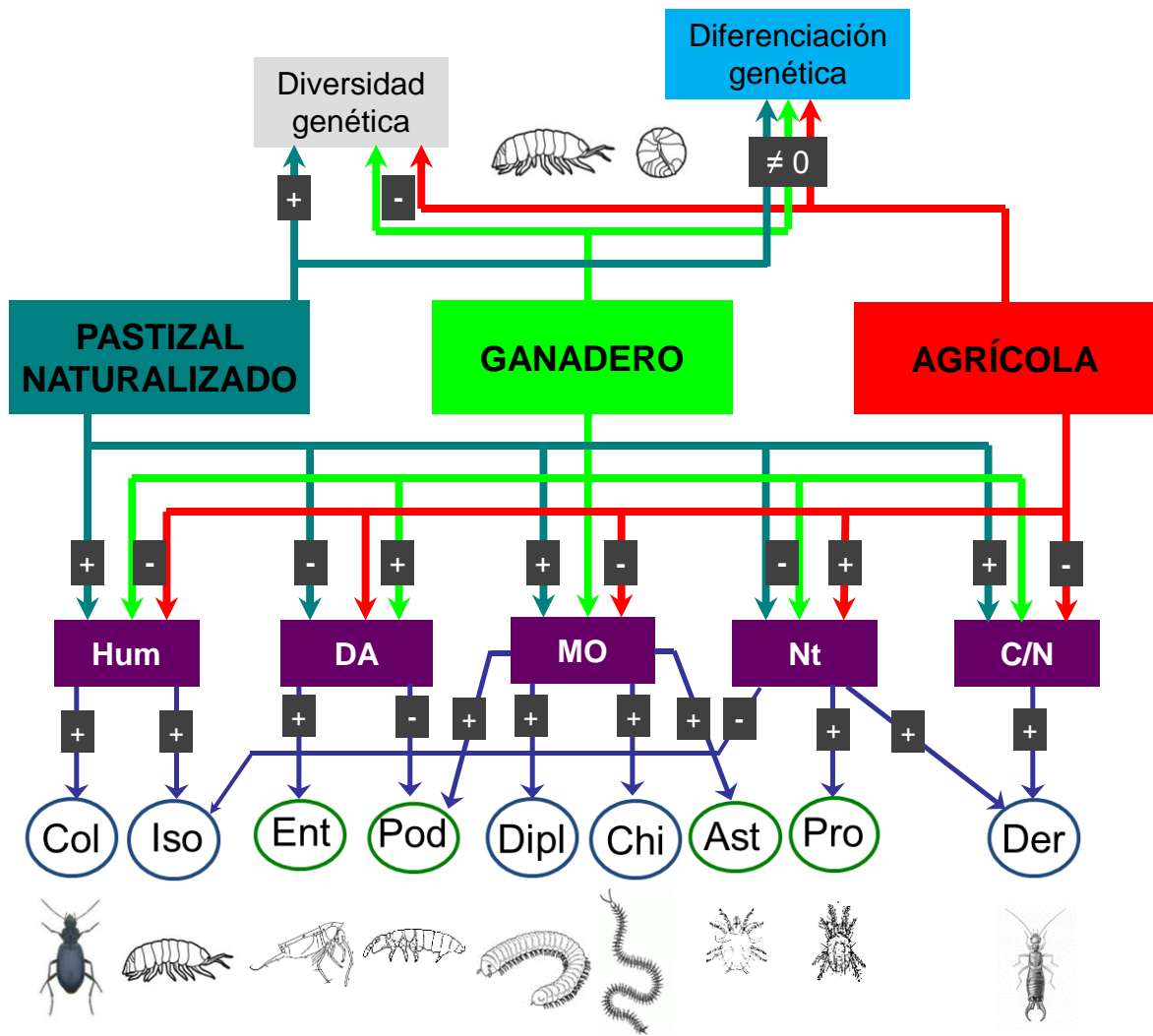


Figura 33. Relaciones entre la diversidad y diferenciación genética de *A. vulgare*, la comunidad de artrópodos y los atributos del suelo.

Hum: Humedad gravimétrica; DA: Densidad aparente; MO: Materia orgánica; Nt: Nitrógeno total; C/N: Relación carbono/nitrógeno. Col: Coleoptera; Iso: Isopoda; Dipl: Diplopoda; Chi: Chilopoda; Der: Dermaptera; Ent: Entomobryomorpha; Pod: Poduromorpha; Ast: Astigmata; Pro: Prostigmata.

En general, se observó que el cambio de sistemas naturalizados a sistemas agrícolas y pecuarios, implicó una disminución en la densidad de grupos de artrópodos del suelo y de la diversidad genética del bicho bolita, a diferentes escalas espaciales y temporales.

5.1 Conclusiones

La diversidad genética de *Armadillidium vulgare* fue menor en el uso agrícola de ambos campos, UNLu y Etchegoyen, respecto a los sistemas naturalizados.

Las distancias genéticas entre pares de individuos mostraron un patrón geográfico que coincide con la separación de los usos en cada campo. Existe evidencia de aislamiento por la distancia y en este sentido, las distancias genéticas fueron mayores entre los usos más alejados entre sí.

La diferenciación genética de *A. vulgare* entre los pastizales naturalizados con los usos agrícola y ganadero fue moderada (valores del coeficiente F_{ST} entre 0.05 y 0.15); mientras que diferenciación genética entre los usos ganadero y agrícola fue baja ($F_{ST} < 0.05$), lo que podría sugerir la importancia de los cuellos de botella y/o los efectos combinados de la deriva genética y la migración.

El análisis molecular de la varianza (AMOVA) para *A. vulgare* mostró que la divergencia entre usos fue mayor para el campo de la Universidad Nacional de Luján que para Etchegoyen.

Los coeficientes θ^H (análogo bayesiano del F_{ST}) y f (análogo del F_{IS}) fueron diferentes de cero para cada campo en conjunto y para las comparaciones entre usos, lo que indicó la existencia de diferenciación genética entre las poblaciones y cierto grado de endogamia.

El análisis de la estructura poblacional de *A. vulgare* evidenció la existencia de siete grupos genéticos diferentes en UNLu y dos en Etchegoyen. La existencia de dos grupos en Etchegoyen sugiere mayor flujo génico, favorecido por la cercanía entre los usos.

Los usos del suelo estudiados presentaron diferencias en la densidad y composición de los grupos taxonómicos que conforman las comunidades de macro y microartrópodos del suelo. La densidad total y el número de taxones fueron mayores en los pastizales naturalizados de ambos sitios, UNLu y Etchegoyen, mientras que los usos agrícolas mostraron densidades significativamente menores.

Del total de taxones considerados, las densidades de los grupos Coleoptera, Chilopoda, Diplopoda, Isopoda, Oribatida, Astigmata y Poduromorpha fueron más afectados por las actividades agropecuarias; mientras que grupos como Araneae, Symphypleona y Entomobryomorpha fueron menos sensibles al cambio en el uso del suelo.

El uso del suelo con fines productivos afectó negativamente la calidad física y química, si se compara con los sistemas naturalizados. Estos efectos fueron desfavorables sobre el contenido de materia orgánica y de humedad en suelos con agricultura convencional; mientras que en los suelos con uso ganadero, la densidad aparente, propiedad relacionada con la compactación, y la humedad del suelo se vieron también alteradas.

Se considera que la cuantificación de las variaciones poblacionales de diferentes grupos taxonómicos, puede constituir una herramienta para la evaluación de los impactos generados por la perturbación del ambiente edáfico sobre diferentes comunidades de fauna del suelo.

El cambio de sistemas naturalizados a sistemas agrícolas y pecuarios, implicó una disminución en la densidad de grupos de artrópodos del suelo y de la diversidad genética del *A. vulgare*, “bicho bolita”, a diferentes escalas espaciales y temporales.

5.2 Consideraciones finales

Teniendo en cuenta las hipótesis iniciales del trabajo y los objetivos particulares planteados, se ha podido caracterizar la variabilidad genética de diferentes grupos de *Armadillidium vulgare* en los campos bajo estudio y dar explicaciones plausibles de los patrones observados. En particular, existe una componente de esta variabilidad que sería explicable principalmente por características generales de los suelos de cada campo y por su grado de heterogeneidad. En un caso, UNLu, el uso predominantemente agrícola estaría produciendo una mayor disminución en la variabilidad genética, mientras que en el otro campo, Etchegoyen, el uso ganadero estaría asociado con una mayor perturbación. En ambos casos, la pérdida de variabilidad, diferenciación y estructura podría usarse como indicador de perturbación del sistema. Entonces el grado de variabilidad genética de poblaciones representativas de grupos funcionales del suelo podría repensarse como un indicador del grado de perturbación de los suelos estudiados.

Un punto clave a tener en cuenta es que si se quisieran fijar niveles de referencia para los indicadores con información genética, se deberían considerar cuidadosamente los componentes derivados de la estructura y calidad general del campo sobre el que se aplican los diferentes grados de perturbación. No obstante, se ha demostrado que otra parte de esa variabilidad es atribuible al tipo de uso del suelo, a su intensidad y al tiempo de uso. Paralelamente, el estudio de la comunidad de macro y microartrópodos y de las propiedades físicas y químicas del suelo, aportan indicadores en otro nivel de organización que, además, se relacionan con otro tipo de funciones y servicios ecosistémicos.

Bibliografía

- Abbot, P. (2001). Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *The Journal of Insect Science 1*: 8-10.
- Agostini MA, Monterubbianesi MG, Studdert GA & Maurette S. (2014). Un método simple y práctico para la determinación de la densidad aparente. *Ciencia del Suelo 32*: 171-176.
- Aizen M, Garibaldi L & Dondo M. (2009). Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecología Austral 19*: 45-54.
- Anderson, J.M. & Ingram, J.S.I. (Eds). (1993). *Tropical soil biology and fertility. A Handbook of Methods*. CAB International. 221 p.
- Association of Analytical Chemists International, AOAC. (1975). *Official Methods of Analysis*. (12th Ed). Washington, D.C.
- Aquino, A.M., Fernandes, M.E. & Alves, M.V. (2008a). Diversidade da macrofauna edáfica no Brasil. Em: Moreira, F., Siqueira, J.O. & Brussaard, L. (Eds). *Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros*. (pp. 143-170). Lavras, Brasil. Ed. UFLA. 768 p.
- Aquino AM, Ferreira Da Silva R, Mercante FM, Fernandes Correia ME, Guimarães MF & Lavelle P. (2008b). Invertebrate soil macrofauna under different ground cover plants in the no-till system in the Cerrado. *European Journal of Soil Biology 44*: 191-197.
- Araujo P, Buckup L & Bond-Buckup G. (1996). Isopodos terrestres (Crustacea, Oniscidea) do Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Serie Zoologia 81*: 111-138.
- Arolfo RV, Bedano JC & Becker AR. (2010). Efectos del cultivo de soja transgénica en siembra directa sobre la taxocenosis de ácaros edáficos en Haplustoles del centro de Córdoba. *Ciencia del Suelo 28 (2)*: 191-200.
- Awise JC, Neigel JE & Arnold J. (1984). Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution 20*: 99-105.
- Balzarini, M.G. & Di Rienzo, J.A. (2003). *InfoGen: Software para análisis estadístico de datos genéticos*. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. & Robledo, C. (2008). *InfoStat. Manual del Usuario*. Córdoba, Argentina. Editorial Brujas.
- Balzarini, M.G. & Di Rienzo, J.A. (2014). *InfoGen versión 2014*. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>
- Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics 64 (2)*: 269-285.
- Beauché F & Richard F-J. (2013). The best timing of mate search in *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Oniscidea). *PLoS ONE 8 (3)*: e57737.

- Bedano JC, Cantú MP & Doucet ME. (2006a). Influence of three different land management practices on soil mite (Arachnida: Acari) densities in relation to a natural soil. *Applied Soil Ecology* 32: 293–304.
- Bedano JC, Cantú MP & Doucet ME. (2006b). Soil springtails (Hexapoda: Collembola), symphylans and pauropods (Arthropoda: Myriapoda) under different management systems in agroecosystems of the subhumid Pampa (Argentina). *European Journal of Soil Biology* 42 (2): 107–119.
- Bedano JC, Domínguez A & Arolfo R. (2011). Assessment of soil biological degradation using mesofauna. *Soil & Tillage Research* 117: 55–60.
- Benevides EA, Vallinoto MNS; Fetter Filho AFH, de Souza JRB, Silva-Oliveira G, Freitas MO, Ferreira BP, Hostim-Silva M, Bertoncini AA, Blanchard F & Torres RA. (2014). When physical oceanography meets population genetics: The case study of the genetic/evolutionary discontinuity in the endangered goliath grouper (*Epinephelus itajara*; Perciformes: Epinephelidae) with comments on the conservation of the species. *Biochemical Systematics and Ecology* 56: 255–266.
- Bernava Laborde, V. & Palacios-Vargas, J.G. (2008). Collembola. En: Claps, L.E., Debandi, G. & Roig-Juñent, S. (Directores). *Biodiversidad de artrópodos argentinos, Volumen 2*. (pp. 151–166). Mendoza, Argentina. Editorial Sociedad Entomológica Argentina.
- Blake, G.R. & Hartge, K.H. (1986). Bulk density. In: Klute, A. (Ed.). *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods. Second Ed. Agronomy Monographs No. 9*. (pp. 363-375). Madison, USA. SSSA. 1173 p.
- Blasi A, Castiñeira Latorre C, Del Puerto L, Prieto AR, Fucks E, De Francesco C, Hanson PR, García-Rodríguez F, Huarte R, Carbonari J & Young A. (2010). Paleoambientes de la Cuenca Media del Río Luján (Buenos Aires, Argentina) durante el último período glacial (EIO 4-2). *Latin American Journal of Sedimentology and Basin Analysis* 17 (2): 85–111.
- 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, Ruse J, Söderström B, Tiedje J & Virginia R. (1997). Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *Ambio* 26 (8): 563–570.
- Callahan Jr MA, Richter Jr DD, Coleman DC & Hofmockel M. (2006). Long-term land-use effects on soil invertebrate communities in Southern Piedmont soils, USA. *European Journal of Soil Biology* 42: S150–S156.

- Chao, A. (1984). Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 11: 265–270.
- Claps, L.E., Debandi, G. & Roig-Juñent, S. (Directores). (2008). *Biodiversidad de artrópodos argentinos, Volumen 2*. Mendoza, Argentina. Editorial Sociedad Entomológica Argentina. 615 p.
- Cole L, Buckland SM & Bardgett RD. (2005). Relating microarthropod community structure and diversity to soil fertility manipulations in temperate grassland. *Soil Biology & Biochemistry* 37 (9): 1707–1717.
- Coleman, D.C., Crossley, D.A. & Hendrix, P.F. (2004). *Fundamentals of soil ecology*. (Second Edition). San Diego. Elsevier Academic Press. 386 p.
- Conti ME, Arrigo N & Palma M. (1980). Variabilidad espacial en determinaciones de carbono, nitrógeno, fósforo y pH de un muestreo sistemático de suelo. *Revista Facultad de Agronomía* 1: 43–48.
- Costa D, Timmermans MJTN, Sousa JP, Ribeiro R, Roelofs D & Van Straalen NM. (2013). Genetic structure of soil invertebrate populations: Collembolans, earthworms and isopods. *Applied Soil Ecology* 68: 61–66.
- Cottingham KL, Lennon JT & Brown BL. 2005. Knowing when to draw the line: Designing more informative ecological experiments. *Frontiers in Ecology and the Environment* 3: 145–152.
- Damiano F & Taboada MA. (2000). Predicción del agua disponible usando funciones de pedotransferencia en suelos agrícolas de la Región Pampeana. *Ciencia del Suelo* 18 (2): 77–88.
- Dauber J, Purtauf T, Allspach A, Frisch J, Voigtländer K & Wolters V. (2005). Local vs. landscape controls on diversity: a test using surface-dwelling soil macroinvertebrates of differing mobility. *Global Ecology and Biogeography* 14 (3): 213–221.
- David J-F & Handa IT. (2010). The ecology of saprophagous macroarthropods (millipedes, woodlice) in the context of global change. *Biological Reviews* 85: 881–895
- Davies, B.E. (1973). Loss on ignition as an estimate of soil organic matter. *Soil Science Society of America Journal* 38 (1): 150–151.
- de Aranzamendi MC, Sahade R, Tatián M & Chiappero MB. (2008). Genetic differentiation between morphotypes in the Antarctic limpet *Nacella concinna* as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Marine Biology* 154: 875–885.
- de Aranzamendi MC, Bastida R & Bastida CN. (2014). Genetic population structure in *Nacella magellanica*: Evidence of rapid range expansion throughout the entire species

- distribution on the Atlantic coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 460: 53–61.
- Decaens T, Mariani L, Betancourt N & Jiménez JJ. (2003). Seed dispersion by surface casting activities of earthworms in Colombian grasslands. *Acta Oecologica* 24: 175–185.
- Desneux N, Decourtye A & Delpuech J-M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *The Annual Review of Entomology* 52: 81-106.
- Díaz Porres M, Rionda MH, Duhour AE & Momo FR. (2014). Artrópodos del suelo: Relaciones entre la composición faunística y la intensificación agropecuaria. *Ecología Austral* 24 (3): 327–334.
- Diekötter T, Wamser S; Woltrs V & Birkhofer K. (2010). Landscape and management effects on structure and function of soil arthropod communities in winter wheat. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 137: 108–112.
- Dindal, D.L. (Ed). (1990). *Soil Biology Guide*. New York. John Wiley & Sons. 1349 p.
- Domínguez A, Bedano JC & Becker AR. (2010). Negative effects of no-till on soil macrofauna and litter decomposition in Argentina as compared with natural grasslands. *Soil & Tillage Research* 110: 51–59.
- Dudley, S.A. (1996). The response to differing selection on plant physiological traits: evidence for local adaptation. *Evolution* 50: 103–110.
- Duhour A, Costa C, Momo F, Falco L & Malacalza L. (2009). Response of earthworm communities to soil disturbance: Fractal dimension of soil and species' rank-abundance curves. *Applied Soil Ecology* 43: 83–88.
- Eguiarte, L.E., Souza, V. & Aguirre. X. (Compiladores). (2007). *Ecología Molecular*. México, D.F. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 594 p.
- Enckell PH, Bengtson SA, Douwes P, Niklasson M, Stille B & Wiman B. (1986). The dispersal pattern of an anthropochorous species: Genetic variation in populations of *Lumbricus terrestris* L. (Lumbricidae) in the Faroe Islands. *Hereditas* 104: 253–261.
- Endlweber K, Schädler M & Scheu S. (2006). Effects of foliar and soil insecticide applications on the collembolan community of an early set-aside arable field. *Applied Soil Ecology* 31: 136–146.
- Evanno G; Regnaut S & Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.

- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Faberi AJ, López AN, Clemente NL & Manetti PL. (2011). Importance of diet in the growth, survivorship and reproduction of the no-tillage pest *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda). *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 407–417.
- Falco LB & Momo FR. (2010). Selección de hábitat: efecto de la cobertura y tipo de suelo en lombrices de tierra. *Acta Zoológica Mexicana* 2:179–187.
- Falush D, Stephens M & Pritchard JK. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578.
- Feijoo A, Knapp EB, Lavelle P & Moreno AG. (1999). Quantifying soil macrofauna in a Colombian watershed. *Pedobiologia* 43: 513–517.
- Feijoo A, Zúñiga MC, Quintero H, Carvajal AF & Ortiz DP. (2010). Patrones de asociación entre variables del suelo y usos del terreno en la cuenca del río La Vieja, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana* 2:151–164.
- Felsenstein, J. (2004). PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6. Distributed by autor. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, Washington.
- Frampton GK & van den Brink PJ. (2007). Collembola and macroarthropod community responses to carbamate, organophosphate and synthetic pyrethroid insecticides: Direct and indirect effects. *Environmental Pollution* 147: 14–25.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge, UK. Cambridge University Press. 619 p.
- Fredes NA; Martínez PA, Bernava Laborde V & Osterrieth ML. (2009). Microartrópodos como indicadores de disturbio antrópico en Entisoles del área recreativa de Miramar, Argentina. *Ciencia del Suelo* 27 (1): 89–101.
- Frouz J, Lobinske R, Kalčík J & Arshad A. (2008). Effects of the exotic crustacean, *Armadillidium vulgare* (Isopoda), and other macrofauna on organic matter dynamics in soil microcosms in a hardwood forest in central Florida. *Florida Entomology* 91 (2): 328–331.
- Futuyma DJ & Moreno G. (1988). The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 207–233.

- Gal A, Vyn TJ, Micheli E, Kladienko EJ & McFee WW. (2007). Soil carbon and nitrogen accumulation with long-term no-till versus moldboard plowing overestimated with tilled-zone sampling depths. *Soil & Tillage Research* 96: 42–51.
- Galantini J & Suñer L. (2008). Las fracciones orgánicas del suelo: Análisis en los suelos de la Argentina. *Agriscientia* 25: 41–55.
- Garthwaite, R.L., Lawson, R. & Sassaman, C. (1995). Population genetics of *Armadillidium vulgare* in Europe and North America. In: Alikhan, M.A. (Ed). *Terrestrial Isopod Biology. Crustacean Issues* 9. (pp. 145–199). A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands.
- Gasmi S, Ferval M, Pelissier C, D'Amico F, Maris T, Tackx M & Legal L. (2014). Genetic diversity among the *Eurytemora affinis* species complex in the Scheldt estuary and its tributaries using ISSR-PCR marker assay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 145: 22–30.
- Gavlak, R., Horneck, D., Miller R.O. & Kotuby-Amacher, J. (2003). *Soil, plant and water reference methods for the Western Region*. (Second Ed). WREP-125, Western Region Extension Publication.
- Gianoli, E. (2004). Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. En: Cabrera, H.M. (Ed). *Fisiología Ecológica en Plantas. Mecanismos y respuestas al estrés en los ecosistemas*. (pp. 13–25). Valparaíso, Chile. EUV. 288 p.
- Giraldo Mendoza, A.E. (2014). Un recuento de argumentos para incluir a los artrópodos terrestres en las prácticas de evaluación ambiental. *Ecología Austral* 24: 258–264.
- Giuffré L, Pascale C, Conti M, Ratto S & Heredia O. (1998). Variabilidad espacial del fósforo extractable a nivel de microescala durante el ciclo de un cultivo de trigo bajo dos sistemas de labranzas. *Agricultura Técnica* 58: 276–284.
- Gonthier DJ, Ennis KK, Farinas S, Hsieh H-Y, Iverson AL, Batáry P, Rudolphi J, Tscharrntke T, Cardinale BJ & Perfecto I. (2014). Biodiversity conservation in agriculture requires a multi-scale approach. *Proceedings of the Royal Society B* 281: 20141358.
- Google Corporation. (2015). Google Maps/Google Earth. Revisión 04/05/2015 desde <https://www.google.com.ar/maps>
- Grant WS & Bowen BW. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity* 89 (5): 415–426.
- Guillot G, Leblois R, Coulon A & Frantz AC. (2009). Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology* 18: 4734–4756.

- Hanski, I. & Gilpin, M.E. (Eds.). (1997). *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution*. San Diego. Academic Press. 532 p.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. (2007). *Principles of population genetics*. (Fourth Edition). Sunderland, Massachusetts, USA. Sinauer Associates, Inc. 670 p.
- Hassall M, Turner JG & Rands MRW. (1987). Effect of terrestrial isopods on the decomposition of woodland leaf litter. *Oecologia* 72: 597–604.
- Hoelzel, A.R. (Ed.). (1998). *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*. (Second Edition). UK. IRL Press at Oxford University Press. 445 p.
- Holsinger, K.E. & Lewis, P.O. (2003). Hickory: A package for analysis of population genetic data version 1.1. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut. <http://www.eeb.unconn.edu/>
- Holsinger KE, Lewis PO & Dey DK. (2002). A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology* 11: 1157–1164.
- Homor P, Pfeiffer I & Péntzes Zs. (2003). Genetic (RAPD) diversity in two *Armadillidium vulgare* populations. *Tiscia* 34: 19–22.
- Hopkin, SP. (1998). Collembola: The most abundant insects on earth. *Anennae* 22: 117–121.
- Hornung E, Tóthmérész B, Magura T & Vilisics F. (2007). Changes of isopod assemblages along an urban–suburban–rural gradient in Hungary. *European Journal of Soil Biology* 43: 158–165.
- Hornung E, Szlavecz K & Dombos M. (2015). Demography of some non–native isopods (Crustacea, Isopoda, Oniscidea) in a Mid–Atlantic forest, USA. *ZooKeys* 515: 127–143.
- InfoStat. (2008). InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat. Facultad de Ciencia Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Jia Y; Lv Y, Kong X, Jia X, Tian K, Du J & Tian X. (2015). Insight into the indirect function of isopods in litter decomposition in mixed subtropical forest in China. *Applied Soil Ecology* 86: 174–181.
- Johannesson K & Mikhailova N. (2004). Habitat-related genetic substructuring in a marine snail (*Littorina fabalis*) involving a tight link between an allozyme and a DNA locus. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 301–306.
- Joy VC, Pramanik R & Sarkar K. (2005). Biomonitoring insecticide pollution using non–target soil microarthropods. *Journal of Environmental Biology* 26: 571–577.
- Kautenburger, R. (2006). Genetic structure among earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) from different sampling sites in western Germany based on random amplified polymorphic DNA. *Pedobiologia* 50: 257–266.

- Kosman E & Leonard J. (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploidy species. *Molecular Ecology* 14: 415–424.
- Lavelle P, Bignell D, Lepage M, Wolters V, Roger P, Ineson P, Heal OW & Dhillion S. (1997). Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology* 33: 159–193.
- Lavelle P, Decaëns T, Aubert M, Barot S, Blouin M, Bureau F, Margarie P, Mora P & Rossi JP. (2006). Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology* 42: 3–15.
- Legendre, P. & Legendre, L. (1998). *Numerical Ecology*. (Second English Edition). Amsterdam. Elsevier Science. 853 p.
- Lowe, A., Harris, S. & Ashton. P. (2004). *Ecological Genetics: Design, analysis and application*. Blackwell Publishing Ltd. 344 p.
- Lynch M & Milligan G. (1994). Analysis of population genetic structure with RADP markers. *Molecular Ecology* 3: 91–99.
- Lynch M, Conery J & Burger R. (1995). Mutational meltdowns in sexual populations. *Evolution* 49 (26): 1067–1080.
- Manrique-Poyato MI, López-León MD, Gómez R, Perfectti F & Camacho JPM. (2013). Population genetic structure of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the South and East of the Iberian Peninsula. *PLoS ONE* 8 (3): e59041.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Manuel-Navarrete D, Gallopín G, Blanco M, Díaz-Zorita M, Ferraro DO, Herzer H, Laterra P, Murmis MR, Podestá GP, Rabinovich J, Satorre EH, Torres F & Viglizzo EF. (2007). Multi-causal and integrated assessment of sustainability: the case of agriculturization in the Argentine Pampas. *Environment, Development and Sustainability* 11: 621–638.
- Maraun M, Salamon J-A, Schneider K, Schaefer M & Scheu S. (2003). Oribatid mite and collembolan diversity, density and community structure in a modern beech forest (*Fagus sylvatica*): effects of mechanical perturbations. *Soil Biology & Biochemistry* 35: 1387–1394.
- Margalef, R. (1991). *Teoría de los sistemas ecológicos*. Barcelona, España. Publicaciones de la Universitat de Barcelona. 290 p.

- Martius C, Höfer H, Garcia MVB, Römbke J & Hanagarth W. (2004). Litter fall, litter stocks and decomposition rates in rainforest and agroforestry sites in central Amazonia. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 68: 137–154.
- Moço MKS, Gama-Rodrigues EF, Gama-Rodrigues AC, Machado RCR & Baligar VC. (2010). Relationships between invertebrate communities, litter quality and soil attributes under different cacao agroforestry systems in the south of Bahia, Brazil. *Applied Soil Ecology* 46: 347–354.
- Momo FR, Giovanetti CM & Malacalza L. (1993). Relación entre la abundancia de distintas especies de lombrices de tierra (Annelida, Oligochaeta) y algunos parámetros fisicoquímicos en un suelo típico de la estepa pampeana. *Ecología Austral* 3: 7–14.
- Momo, F.R. & Falco, L.B. (Compiladores). (2009). *Biología y ecología de la fauna del suelo*. (Primera Edición). Universidad Nacional de General Sarmiento. Buenos Aires, Argentina. Ediciones Imago Mundi. 208 p.
- Morrone, J.J. & Coscarón, S. (1998). *Biodiversidad de artrópodos argentinos: Una perspectiva biotaxonomica*. Sur Ediciones. 599 p.
- Nei M & Li W-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 76: 5269–5273.
- Nelson MF & Anderson N. (2013). How many marker loci are necessary? Analysis of dominant marker data sets using two popular population genetic algorithms. *Ecology and Evolution* 3 (10): 3455–3470.
- Orgeira MJ; Vásquez CA, Compagnucci RH, Raposo I & Pereyra FX. (2009). Magnetismo de rocas en suelos actuales de la Pampa Ondulada, provincia de Buenos Aires, Argentina. Vinculación del clima con el comportamiento magnético. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 26 (1): 65–78.
- Palacios-Vargas, JG. (2014). Biodiversidad de Collembola (Hexapoda: Entognatha) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: S220–S231.
- Palma J, Maebe K, Guedes JVC & Smagghe G. (2015). Molecular variability and genetic structure of *Chrysodeixis includes* (Lepidoptera: Noctuidae), an important soybean defoliator in Brazil. *PLoS ONE* 10 (3): e0121260.
- Pankhurst, C.E., Doube, B.M. & Gupta, V. (Eds.). (1997). *Biological indicators of Soil Health*. CAB International. 450 p.
- Paoletti MG & Bressan M. (1996). Soil invertebrates as bioindicators of human disturbance. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15 (1): 21–62.

- Paoletti MG & Hassall M. (1999). Woodlice (Isopoda: Oniscidea): Their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. *Agriculture, Ecosystem & Environment*, 74: 157–165.
- Paoletti MG, Osler GHR, Kinnear A, Black DG, Thomson LJ, Tsitsilas A, Sharley D, Judd S, Neville P & D’Inca A. (2007). Detritivores as indicators of landscape stress and soil degradation. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47: 412–423.
- Paris, O.H. (1963). The ecology of *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea) in California grassland: food, enemies and weather. *Ecological Monographs* 33:1–22.
- Peakall R & Smouse PE. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.
- Peles JD, Towler WI & Guttman SI. (2003). Population genetic structure of earthworms (*Lumbricus rubellus*) in soils contaminated by heavy metals. *Ecotoxicology* 12: 379–386.
- Pengue, W. (2005). *Agricultura industrial y transnacionalización en América Latina*. Ciudad de México. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).
- Peña Guzmán, L.E. (2006). *Introducción al estudio de los insectos de Chile*. (Séptima Edición). Santiago de Chile, Chile. Editorial Universitaria. 255 p.
- Pérez TM, Guzmán-Cornejo C, Montiel-Parra G, Paredes-León R & Rivas G. (2014). Biodiversidad de ácaros en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: S399–S407.
- Petersen, H. (2002). General aspects of collembolan ecology at the turn of the millennium. *Pedobiologia* 46: 246–260.
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly M. (2000). Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C & Raimond R. (1999). Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the Isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 152: 1669-1677.
- Roux O, Gevrey M, Arvanitakis L, Gers C, Bordat D & Legal L. (2007). ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 240–250.
- Salvio C, Manetti PL, Clemente NL & López AN. (2014). Efectos de Carbaryl y Metaldehído sobre *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda) y *Milax gagates* (Mollusca: Pulmonata) en soja bajo siembra directa. *Agrociencia Uruguay* 18: 82–89.
- Sambrook, J. & Russel, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Third Ed). New York. Cold Spring Harbor Laboratory.

- Schlichting CD & Levin DA. (1986). Phenotypic plasticity: An evolving plant character. *Biological Journal of the Linnean Society* 29: 37–47.
- Scoppa, C.O. & Vargas Gil, J.R. (1969). Delimitación de subzonas geomorfológicas en un sector de la región pampeana y sus relaciones edafogenéticas. En: *Actas de la V Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo*. (pp: 424–435).
- Sesarini C & Remis MI. (2008). Molecular and morphometric variation in chromosomally differentiated populations of the grasshopper *Sinipta dalmani* (Orthoptera: Acrididae). *Genetica* 133: 295–306.
- Sfeir, A., Costa, M.C., Stavinsky, A., Bonvecchi, V. & Penón, E. (1989). *Mapa Básico de Suelos*. Universidad Nacional de Luján.
- Sfenthourakis S, Anastasiou I & Strutenschi T. (2005). Altitudinal terrestrial isopod diversity. *European Journal of Soil Biology* 41: 91–98.
- Shaklee JB & Samollow PB. (1984). Genetic variation and population structure in a deepwater snapper, *Pristipomoides filamentosus*, in the Hawaiian Archipelago. U.S. National Marine Fisheries Service. *Fishery Bulletin* 82:703–713.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787–792.
- Southwood, T.R.E. (1980). *Ecological Methods*. (Second Ed). New York, USA. Chapman & Hall. 524 p.
- Špaldoňová A & Frouz J. (2014). The role of *Armadillidium vulgare* (Isopoda: Oniscidea) in litter decomposition and soil organic matter stabilization. *Applied Soil Ecology* 83: 186–192.
- Sullivan TJ, Dreyer AP & Peterson JW. (2009). Genetic variation in a subterranean arthropod (*Folsomia candida*) as a method to identify low-permeability barriers in an aquifer. *Pedobiologia* 53 (1): 99–105.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A & Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Vekemans, X. (2002). AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M & Roldán-Ruiz I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11: 139–151.

- Velásquez E, Lavelle P & Andrade M. (2007). GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 3066–3080.
- Verne S, Puillandre N, Brunet G, Gouin N, Samollow PB, Anderson JD & Grandjean F. (2006). Characterization of polymorphic microsatellite loci in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*. *Molecular Ecology Notes* 6: 328–330.
- Viglizzo EF; Lértora F, Pordomingo AJ, Bernardos JN, Roberto ZE & Del Valle H. (2001). Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 83: 65–81.
- Viglizzo EF; Frank FC, Carreño LV, Jobbágy EG, Pereyra H, Clatt J, Pincén D & Ricard MF. (2011). Ecological and environmental footprint of 50 years of agricultural expansion in Argentina. *Global Change Biology* 17: 959–973.
- Vijayan K, Anuradha HJ, Nair CV, Pradeep AR, Awasthi AK, Saratchandra B, Rahman SAS, Singh KC, Chakraborti R & Urs SR. (2006). Genetic diversity and differentiation among populations of the Indian eri silkworm, *Samia Cynthia ricini*, revealed by ISSR markers. *Journal of Insect Science* 6: 30.
- Villarino, SV, Manetti PL, López AN, Clemente NL & Faberi AJ. (2012). Formulaciones con combinación de ingredientes activos para el control de *Armadillidium vulgare* (Crustacea: Isopoda), plaga en el cultivo de colza. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 30: 91–96.
- von der Schulenburg JHG, Hancock JM, Pagnamenta A, Sloggett JJ, Majerus MEN & Hurst GDD. (2001). Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Molecular Biology & Evolution* 18: 648–660.
- Warburg, M.R. (1968). Behavioral adaptations of terrestrial isopods. *American Zoologist* 8 (3): 545–559.
- Warburg MR, Linsenmair, KE & Bercovitz K. (1984). The effect of climate on the distribution and abundance of isopods. *Symposia of the Zoological Society of London* 53: 139–156.
- Winter JP, Voroney RP & Ainsworth DA. (1990). Soil microarthropods in long-term no-tillage and conventional tillage corn production. *Canadian Journal of Soil Science* 70: 641–653.
- Wolfe, A.D. & Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S. & Doyle, J.J. (Eds.). *Plant Molecular Systematics II*. (pp: 43–86). Kluwer, Boston.

- Wolfe, A.D. (2005). ISSR Techniques for Evolutionary Biology. In: Zimmer, E.A. & Roalson, E.H. (Eds.). *Methods in Enzymology. Volume 395 Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data (Part B)*. (pp: 134–144). Academic Press.
- Wolters, V. & Ekschmitt, K. (1997). Gastropods, Isopods, Diplopods, Chilopods: Neglected groups of the decomposer food web. In: Benckiser, G. (Ed.). *Fauna in soil ecosystems. Recycling processes, nutrient fluxes, and agricultural production*. (pp: 265–306). New York, USA. Marcel Dekker, Inc.
- Workman PL & Niswander JD. (1970). Population studies on Southwestern Indian Tribes. II. Local Genetic Differentiation in the Papago. *The American Journal of Human Genetics* 22 (1): 24–49.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics* 28 (2): 114–138.
- Wright, S. (1946). Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31: 39–59.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323–354.
- Wright, S. (1978). *Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability within and among natural populations*. Chicago. University of Chicago Press.
- Xiao NW, Song Y, Ge F, Liu XH & Ou-Yang ZY. (2006). Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere* 65: 907–912.
- Zhivotovsky, L.A. (1999). Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 907–913.
- Zietkiewicz E, Rafalski A & Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.
- Zimmer, M. (2002). Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary–ecological approach. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 77: 455–493.

Apéndice

Apéndice 1. Descripción de los marcadores ISSR

Los ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat o regiones intermedias entre secuencias simples repetidas) son marcadores genéticos semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o *primer* complementario a un microsatélite (Figura A1). La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el DNA se replica durante la meiosis, la DNA polimerasa puede “tartamudear” hacia adelante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2005).

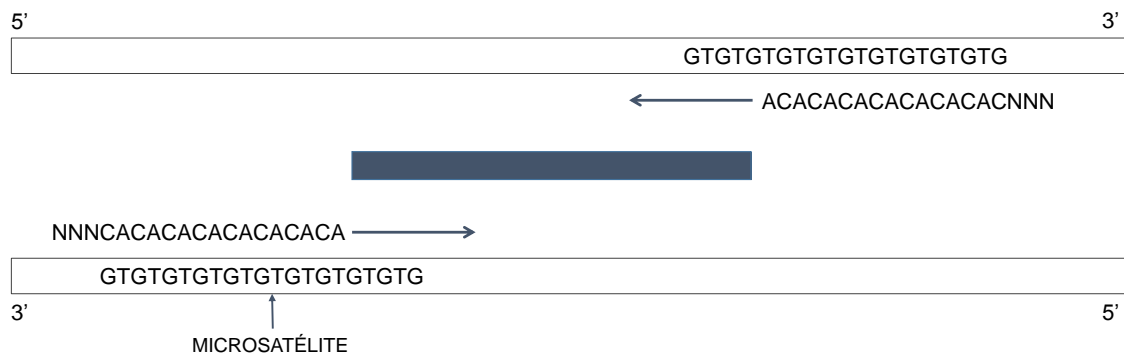


Figura A1. Amplificación con un *primer* $(CA)_n$ anclado en el extremo 5' con tres nucleótidos extras. Se amplifica el segmento intermedio entre dos secuencias de microsatélite en orientación invertida. Redibujado de Eguiarte *et al.* (2007).

La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un “locus”, que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homócigo o heterócigo), mientras que su ausencia representa el genotipo homócigo recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus. La ausencia de una banda puede deberse a varios factores como la no existencia de un sitio de unión completo al primer debido a una mutación, re-arreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis, y/o

inserciones o deleciones suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifica como un locus diferente. Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR. Asimismo, no son necesarias altas concentraciones de ADN. Por otro lado, para diseñar los *primers* no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio.

En cuanto a las desventajas, la homología de las bandas es incierta, además al ser marcadores dominantes, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterocigos de los homocigos dominantes (como F_{IS} y F_{IT} ; Wright, 1965). Asimismo, para estimar la heterocigosis poblacional es necesario asumir *a priori* que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que las estimaciones de heterocigosis y estructuración genética pueden sesgarse un poco, aunque existen correcciones estadísticas (Lynch & Milligan, 1994).

Apéndice 2. Perfiles de amplificación de *Armadillidium vulgare* con los marcadores ISSR.

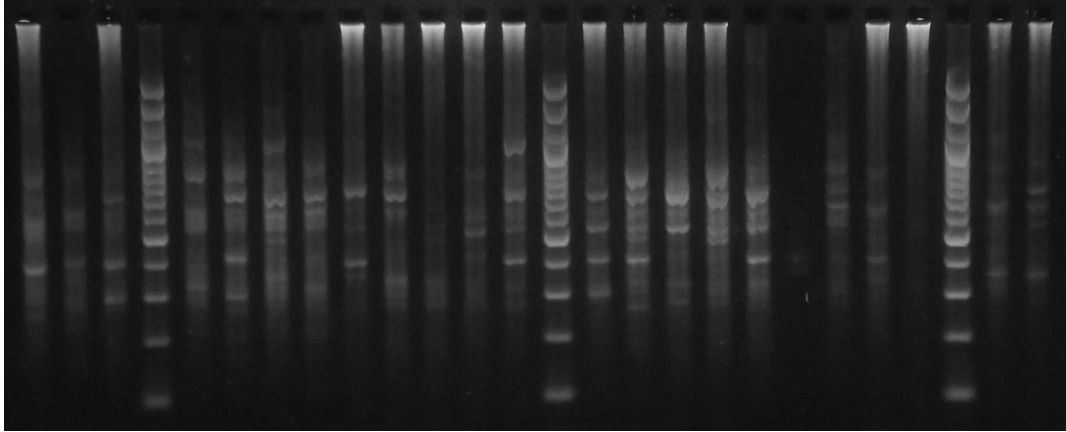


Figura A2. Perfil de amplificación de *A. vulgare* usando el *primer* ISSR 1 (CA)₇AC. De izquierda a derecha: 154, 157, 158, M (100 pb), 159, 160, 165, 166, 169, 232, 233, 234, 235, M (100 pb), 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 244, 245, M (100 pb), 315 y 316 (Agrícola Etchegoyen).

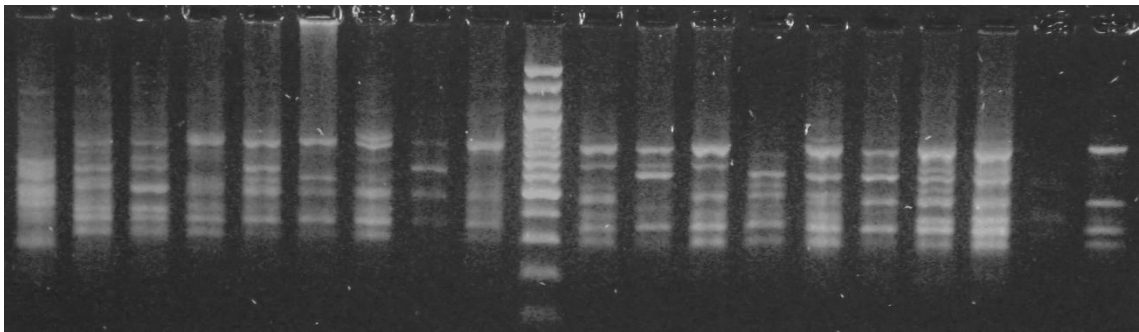


Figura A3. Perfil de amplificación de *A. vulgare* usando el *primer* ISSR 3 (CA)₇AG. De izquierda a derecha: 207, 230, 231 (Naturalizado UNLu), 232, 233, 234, 235, 236, 237, M (100 pb), 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245 (Agrícola Etchegoyen), 173 y 174 (Ganadero Etchegoyen).

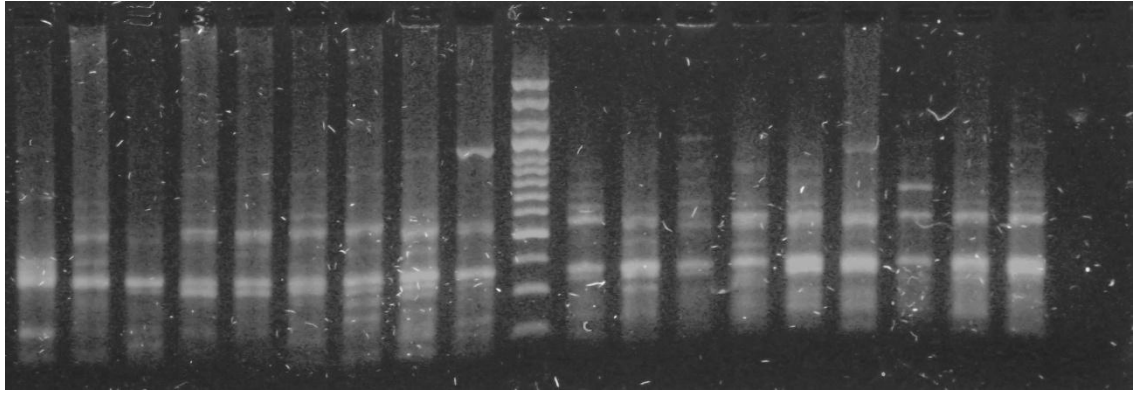


Figura A4. Perfil de amplificación de *A. vulgare* usando el *primer* ISSR 7 (AC)₈G.

De izquierda a derecha: 204 (Agrícola Etchegoyen), 207 (Naturalizado UNLu), 154, 155, 157, 158, 159, 160, 165, M (100 pb), 166, 167, 168, 169, 170 (Agrícola Etchegoyen), 171, 172, 173, 174 (Ganadero Etchegoyen) y control negativo (sin ADN).

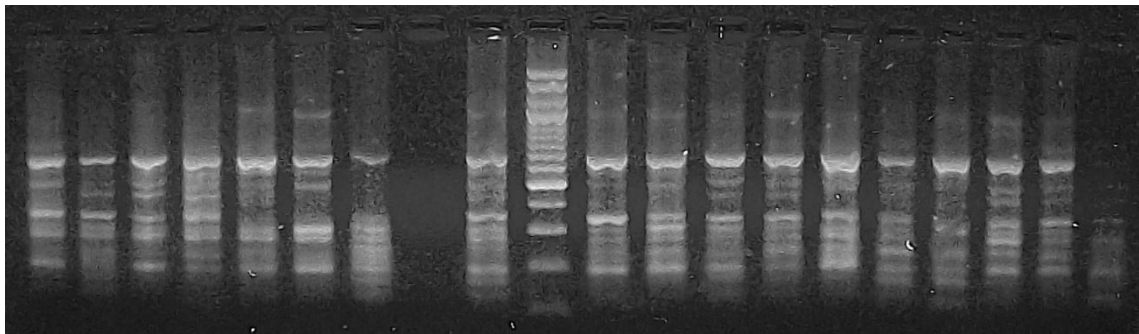


Figura A5. Perfil de amplificación de *A. vulgare* usando el *primer* ISSR 8 (AG)₈T.

De izquierda a derecha: 205 (Naturalizado Etchegoyen), 154, 155, 157, 158, 159 (Agrícola Etchegoyen), 191 (Ganadero Etchegoyen), control negativo (sin ADN), 192 (Ganadero Etchegoyen), M (100 pb), 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201 y 202 (Ganadero Etchegoyen).