

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE TARDÍGRADOS EN EL CONTROL DEL
NEMÁTODO (*Meloidogyne sp.*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO**

LUIS EDUARDO MOROCHO ANALUISA

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
ESTRUCTURADO DE MANERA INDEPENDIENTE PRESENTADO COMO
REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

CEVALLOS – ECUADOR

2010

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

La responsabilidad del diseño del presente trabajo de investigación, nos corresponde exclusivamente a: Luis Eduardo Morocho Analuisa, autor del trabajo de investigación y al Patrimonio Intelectual de la Universidad Técnica de Ambato.

Luis Eduardo Morocho Analuisa
AUTOR

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE TARDÍGRADOS EN EL CONTROL DEL
NEMÁTODO (*Meloidogyne sp.*) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO**

REVISADO POR:

.....

**Ing. Mg. HERNÁN ZURITA
TUTOR**

.....

**Ing. Mg. FIDEL RODRÍGUEZ
BIOMETRISTA**

APROBADO POR EL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN CONFORMADO POR:

.....

Ing. Mg. FIDEL RODRÍGUEZ

.....

Ing. EDUARDO FIALLOS

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres Zoila y Guillermo quienes me han apoyado siempre y de manera incondicional. A mis hermanos Edwin y Fabián. A Mónica, por estar siempre conmigo en mis triunfos y derrotas, apoyándome siempre, con inmenso amor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica de Ambato y muy en particular a la Facultad de Ingeniería Agronomía, por acogerme y darme la oportunidad de superarme para poder cumplir con mis metas y sueños.

A las autoridades y profesores de la Facultad de Ingeniería Agronómica, en especial al Ing. Mg. Hernán Zurita, tutor, por sus valiosos conocimientos, consejos y amistad, que me permitieron desarrollar y llevar a cabo con éxito, el presente trabajo de investigación.

Al Ing. Mg. Fidel Rodríguez y al Ing. Eduardo Fiallos por sus valiosos conocimientos y ayuda para el mejor desarrollo del trabajo de investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
RESUMEN EJECUTIVO.....	XIII
I. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
1.1 TEMA.....	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	1
1.4 OBJETIVOS.....	2
1.4.1 General.....	2
1.4.2 Específicos.....	2
II. MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS.....	3
2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	3
2.2 MARCO CONCEPTUAL.....	4
2.2.1 Tardígrados.....	4
2.2.1.1 Definición.....	4
2.2.1.2 Estructura y Morfología.....	4
2.2.1.3 Criptobiosis.....	7
2.2.1.4 Reproducción.....	8
2.2.1.5 Descripción Geográfica.....	8
2.2.1.6 Filogenia.....	8
2.2.2 Meloidogyne sp.....	8
2.2.2.1 Ciclo Biológico.....	9
2.2.2.2 Síntomas.....	10
2.2.2.3 Control.....	10
2.2.2.4 Aislamiento.....	11
2.3 HIPÓTESIS.....	12

2.4 VARIABLES DE LA HIPÓTESIS.....	12
2.4.1 Variable Dependiente.....	12
2.4.2 Variable Independiente.....	12
2.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	13
III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
3.1 ENFOQUE, MODALIDAD Y TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	14
3.2 UBICACIÓN DEL ENSAYO.....	14
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR.....	14
3.3.1 Clima.....	14
3.3.2 Agua.....	14
3.4 FACTORES EN ESTUDIO.....	15
3.4.1 Tardígrados.....	15
3.4.2 Proporción.....	15
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
3.6 TRATAMIENTOS.....	15
3.7 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	16
3.8 DATOS TOMADOS.....	16
3.8.1 Porcentaje de control.....	16
3.8.2 Tipo de control.....	16
3.8.3 Porcentaje de tardígrados activos.....	16
3.8.4 Porcentaje de tardígrados inactivos.....	17
3.9 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	17
3.9.1 Análisis estadístico.....	17
3.10 MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN.....	17

3.10.1 En campo para identificación de tardígrados.....	17
3.10.1.1 Muestreo del sustrato.....	17
3.10.2 En campo para identificar Meloidogyne.....	17
3.10.2.1 Observación directa a simple vista.....	17
3.10.2.2 Muestreo de raíces y suelo.....	18
3.10.3 En el laboratorio.....	18
3.10.3.1 Observación preliminar al microscopio.....	18
3.10.3.2 Aislamiento de tardígrados.....	18
3.10.3.3 Aislamiento de Meloidogyne sp.....	19
3.10.3.4 Aplicación de tratamientos.....	19
3.10.3.5 Pruebas de resistencia para tardígrados.....	20
3.10.3.5.1 Temperatura.....	20
3.10.3.5.2 Éter dietílico.....	20
3.10.3.5.3 Alcohol antiséptico.....	20
3.10.3.5.4 Carbofurán.....	21
3.10.3.5.5 pH.....	21
3.1.3.5.6 Formol.....	21
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
4.1 RESULTADOS ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISCUSIÓN.....	23
4.1.1 Porcentaje de control.....	23
4.1.2 Tipo de control.....	25
4.1.3 Porcentaje de tardígrados activos.....	26
4.1.4 Porcentaje de tardígrados inactivos.....	27
4.1.5 Pruebas de resistencia.....	29
4.1.5.1 Temperatura.....	29

4.1.5.2 Éter dietílico	31
4.1.5.3 Alcohol antiséptico	32
4.1.5.4 Carbofurán.....	33
4.1.5.5 pH.....	33
4.1.5.6 Formol.....	35
4.2 VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	35
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
5.1 CONCLUSIONES.....	37
5.2 RECOMENDACIONES.....	39
VI. PROPUESTA.....	41
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	48
VIII. APÉNDICE.....	50

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 1. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	13
CUADRO 2. TRATAMIENTOS.....	15
CUADRO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE CONTROL DEL NEMÁTODO MELOIDOGYNE SP. EN LA EVALUACIÓN DE LA EFICIACIA DE TARDÍGRADOS.....	22
CUADRO 4. PROMEDIOS Y DMS AL 5% PARA TARDÍGRADOS EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE CONTROL.....	23
CUADRO 5. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA PROPORCIÓN EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE CONTROL.....	24
CUADRO 6. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN TARDÍGRADOS Y PROPORCIÓN EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE CONTROL.....	25
CUADRO 7. TIPO DE CONTROL DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS.....	25
CUADRO 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS ACTIVOS EN LA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE TARDÍGRADOS.....	26
CUADRO 9. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN TARDÍGRADOS Y PROPORCIÓN EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS ACTIVOS.....	27
CUADRO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS INACTIVOS EN LA EVALUACIÓN DE LA EFICIACIA DE	

TARDÍGRADOS.....	28
CUADRO 11. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN TARDÍGRADOS Y PROPORCIÓN EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS INACTIVOS.....	29
CUADRO 12. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	30
CUADRO 13. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS AL ÉTER DIETÍLICO.....	31
CUADRO 14. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS AL ALCOHOL ANTISÉPTICO.....	32
CUADRO 15. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS AL CARBOFURÁN.....	33
CUADRO 16. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS A ESCALAS DE PH ÁCIDO, NETRO Y BÁSICO.....	34
CUADRO 17. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS AL FORMOL.....	35
CUADRO 18. TRATAMIENTOS (PROPUESTA).....	44

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

	Pág.
FIGURA 1. ESTRUCTURA DE UN TARDÍGRADO.....	6
FIGURA 2. CROQUIS DEL ENSAYO.....	50

RESUMEN EJECUTIVO

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la “Granja Docente Experimental Querochaca” propiedad de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Ambato, ubicada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, situado a 2 850 msnm.

La investigación se basó en la evaluación de la eficacia de dos ecotipos de tardígrados localizados en Huambaló (provincia de Tungurahua) y Saquisilí (provincia de Cotopaxi), utilizados para el control del nemátodo agallador (*Meloidogyne sp.*) bajo condiciones de laboratorio. Se empleó un total de 120 tardígrados para los dos ecotipos y 120 nemátodos, los cuales se distribuyeron en 6 tratamientos con 3 repeticiones; se aplicó el diseño de bloques completamente al azar. Los factores en estudio fueron: Tardígrados (T1 = tardígrado Huambaló, T2 = tardígrado Saquisilí) y el segundo factor fue Proporción (1:1 (5 tardígrados y 5 nemátodos), 2:1 (10 tardígrados y 5 nemátodos) 1:2 (5 tardígrados y 10 nemátodos)). Los tardígrados y nemátodos fueron ubicados en blíster de pastillas con un área individual de 0,78 cm², conjuntamente con 0,15 gramos de materia orgánica esterilizada y 2 gotas de agua destilada.

Con el presente trabajo de investigación se demuestra que los tardígrados localizados en nuestro medio, son capaces de depredar nemátodos del género *Meloidogyne sp.*, presentándose los mejores resultados con los tardígrados de la localidad Huambaló, taxonómicamente definido como *Milnesium tardigradum*, una especie carnívora que habita musgos que se desarrollan sobre los techos de las casas; con esta especie se alcanzó un 70,00% de control en proporción de 2:1 (10 tardígrados y 5 nemátodos). El tipo de control que ejerció esta especie es absorber o consumir enteramente a los nemátodos, puesto que se utilizaron nemátodos en estado juvenil, de inferior tamaño en relación con los tardígrados; resultados obtenidos en un lapso de tiempo de 12 días bajo condiciones de laboratorio.

I. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 TEMA

Evaluación de la eficacia de tardígrados en el control del nemátodo (*Meloidogyne sp.*) bajo condiciones de laboratorio.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los nemátodos se encuentran en casi todos los hábitats, pero a menudo pasan por desapercibido porque la mayoría de ellos son de tamaño microscópico. Un campo agrícola puede contener varios millones de nematodos. Muchas de estas especies son parásitas de plantas que pueden causar pérdidas económicas, cuando se presentan condiciones que los favorecen y sus poblaciones se elevan desmedidamente. Sin embargo, aún cuando las poblaciones son bajas, estas pueden actuar como agentes fitopatológicos primarios, que debilitan, predisponen o causan heridas, que permiten la infección por otros microorganismos, como los hongos o bacterias.

Meloidogyne sp., es un nemátodo formador de nódulos de la raíz que daña a las plantas al debilitar las puntas de la raíz y al inhibir su desarrollo o estimular una formación radical excesiva, pero principalmente al inducir a la formación de hinchamientos en las raíces, las cuales no sólo privan a las plantas de sus nutrientes sino también deforman y disminuyen el valor comercial de muchas raíces de los cultivos. Ante este problema se puede realizar un control biológico a partir de sus enemigos naturales que igualmente son habitantes del suelo como son los tardígrados que se los considera como depredadores de los nemátodos.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Según Cepeda (1995), la reducción de rendimiento causada por los nemátodos fitoparásitos en cultivos se ubica alrededor del 12,3% a nivel mundial. Sin embargo, en situaciones de monocultivo, las pérdidas pueden llegar al 80% y, si el órgano afectado es la parte comercial, las pérdidas pueden ser totales. Hay que hacer notar también que la casi totalidad de las enfermedades fungosas y bacterianas en plantas, están asociadas con nemátodos.

Según el mismo autor, la agricultura resulta afectada por la elevada producción de nematodos, según datos obtenidos en investigaciones muestran que en un centímetro cúbico de tierra puede haber miles de individuos, pudiendo haber hasta 18 000 en un gramo de trigo y más de 6 800 en un gramo de tejido de tallo de cocotero.

Por lo antes mencionado, se plantea una alternativa para realizar un control biológico del nemátodo *Meloidogyne sp.*, empleando a sus enemigos naturales como son los tardígrados bajo condiciones de laboratorio, con el fin de determinar la eficacia de los mismos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la eficacia de tardígrados como depredadores del nemátodo *Meloidogyne sp.*, a fin de disminuir la población de los mismos bajo condiciones de laboratorio.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislar pequeñas poblaciones de tardígrados de dos ecosistemas en los que se desarrollan.

Determinar el grado de control de *Meloidogyne sp.*, por acción de los tardígrados en condiciones de laboratorio.

Someter a los tardígrados a pruebas de resistencia en laboratorio a fin de conocer las condiciones extremas a las que pueden sobrevivir (temperatura, éter dietílico, alcohol antiséptico, carbofuran, pH ácido y básico, formol).

II. MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Jerez y Narváez (2001), realizaron la investigación “Tardígrados en Musgos de la Reserva el Diviso (Santander, Colombia)” donde se registran 14 especies, 8 de las cuales son nuevos registros para el país, ya que desde el trabajo de Marcus (1936) no se han realizado estudios similares sobre este grupo. El Diviso es una reserva ubicada en la microcuenca del río Frío Alto y la subcuenca del mismo, entre los 1 700- 2 100 metros de altura, con una temperatura promedio de 16° C, localizada a 22,5 km de la ciudad de Bucaramanga a un costado de la vía que conduce a la ciudad de Cúcuta. Es propiedad de la Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga CDMB. Su área total es de 85 hectáreas, de las cuales 69 corresponden a bosque natural, 15 a plantaciones de cipreses (*Cupresus lusitanica*) y pino pátula (*Pinus patula*), y una hectárea en la cual se localiza una casa y áreas para cultivo.

Romero et al. (2009), realizaron el estudio “Tardígrados habitantes de un bosque templado de montaña, estudio preliminar” para detectar la presencia de estos organismos en diferentes sustratos de un bosque templado de pino-encino, en la Sierra Norte de Oaxaca. Se realizaron tres muestreos: febrero 2008, septiembre 2008 y junio 2009, en cada uno se tomaron muestras en 16 pteridofitas, 60 bromelias epífitas tipo tanque de tres especies (*Tillandsia carlos-hankii*, *T. prodigiosa* y *T. violácea*, 10/sp./temporada) y 6 de suelo, las muestras fueron transportadas al laboratorio y con ayuda de un microscopio óptico y claves se determinaron las especies de tardígrados presentes en cada sustrato. Se encontraron 13 especies de tardígrados, cinco en pteridofitas, nueve en bromelias y dos en suelo; *Macrobiotus harmsworthi* grup sólo se encuentra en pteridofitas; *Diphascon higginsi*, *Diphascon pingüe*, *Diphascon pingüiforme*, *Diphascon pingüe* grup. *Hypsibius cf. convergens*, y *Paramacrobiotus sp.* sólo se encuentran en bromelias; mientras que *Calcarobiotus sp.* y *Diphascon sp.* sólo están en suelo; mientras que *Milnesium reductum*, *Equiniscus kerguelensis* y *Minibiotus sp.*, se comparten entre bromelias y pteridofitas; ninguna especie de suelo se encuentra en otro sustrato.

2.2 MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 Tardígrados

2.2.1.1 Definición

Jerez y Narváez (2001), mencionan que los tardígrados son invertebrados microscópicos con simetría bilateral, un cuerpo cilíndrico con cuatro pares de patas terminadas en uñas cuya forma y número es variable. El cuerpo puede ser plano en la parte ventral y convexo en la dorsal, dividido en cinco segmentos: uno cefálico, tres troncales y uno terminal que corresponde al último par de patas. Su longitud varía de 0,1 mm a 1,5 mm. Los animales activos son encontrados en el agua intersticial de sedimentos marinos y de agua dulce, en el suelo, y en plantas acuáticas y terrestres como algas, musgos, hepáticas y líquenes.

Wikipedia (2010), señala que los tardígrados, denominados comúnmente osos de agua, son un filo de pequeños invertebrados de 0,1 a 1,2 mm que habitan en lugares húmedos. Algunos autores todavía los consideran una clase de artrópodos. Se conocen más de 750 especies de tardígrados. Son especialmente abundantes en la película de humedad que recubre musgos y helechos, aunque no faltan especies oceánicas y de agua dulce, no habiendo virtualmente rincón del mundo que no pueblen.

Encarta (2009), señala que tardígrados es el nombre con que se conoce a los animales pertenecientes a determinado filo de protóstomos de pequeño tamaño, de menos de un milímetro de longitud. Son principalmente animales terrestres que habitan en el agua que se deposita sobre las plantas (líquenes y musgos), aunque también hay especies de agua dulce y agua marina, medios en los que se encuentran bien sobre plantas o bien en los fondos blandos fangosos o arenosos, desde las zonas de aguas litorales hasta las profundas.

2.2.1.2 Estructura y Morfología

Wikipedia (2010), indica que están dotados de simetría bilateral, con la zona ventral aplanada y la dorsal convexa, los tardígrados constan de cinco segmentos no diferenciados. Un segmento cefálico de forma roma contiene la boca y, en ocasiones, puntos oculares y cirros sensoriales. Los cuatro segmentos restantes tienen cada uno un par de patas ventrolaterales terminadas con garras (entre cuatro y ocho); normalmente los

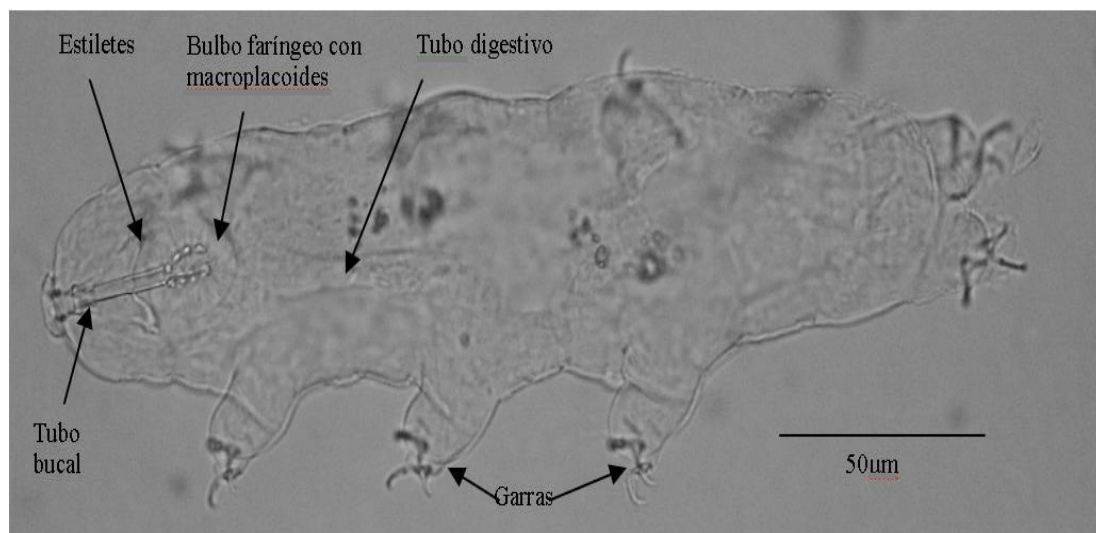
primeros tres pares se destinan a la locomoción mientras que el cuarto sirve para anclarse al sustrato dado que los tardígrados son extremadamente ligeros e incluso una leve brisa puede arrastrarlos fácilmente. La cutícula exterior que los recubre puede ser de una gran variedad de colores. Los tardígrados son ovíparos y experimentan un desarrollo directo, sin fases larvianas. Carecen de aparato circulatorio, respiratorio y excretor. Poseen unas células (matoxistemas) que les permiten sobrevivir en cualquier medio ya sea: agua, aire o vacío.

Sielfeld (2003), expresa que los tardígrados conforman un pequeño grupo de animales de vida marina, agua dulce y de ambientes húmedos; talla pequeña de alrededor de 1 mm de longitud. Cuerpo alargado, de simetría bilateral, con la región dorsal más o menos convexa y la cara ventral plana; portan 4 pares de patas cortas, que terminan en garras, son variables en su forma y número. El cuerpo se encuentra cubierto por una cutícula quitinosa, que penetra la boca y el recto; la conformación de la cutícula es variable, considerando desde formas totalmente lisas hasta otras con placas de tipo imbricado. El cuerpo presenta una serie de apéndices de posición constante entre las diversas especies y grupos, tales como simples expansiones cuticulares (filamentos y espinas) del tipo apéndices sensoriales, cilio mediano o rostral, cilios bucales, clavas y espina caudal, entre otras. Los cuatro pares de patas son de inserción lateroventral en el cuerpo; el cuarto par limita con el orificio anal; todas las patas terminan en garras.

Wikipedia (2010), enuncia que lo más destacado del aparato digestivo es su estructura bucal. Se caracteriza por una abertura bucal formada por unos tres anillos de cutícula embebida hacia la cavidad interior. Además posee una faringe tubular y una faringe succionadora, en la que hay unos potentes músculos circulares que hacen los movimientos de succión. En esta musculatura hay unas estructuras esclerotizadas denominadas macroplacoides, que dan rigidez a la estructura y además suponen un punto de inserción para los músculos succionadores. A la estructura de la boca va asociada dos estiletes punzantes que están asociados a músculos retractores y protractores. Su función es atravesar las paredes de los vegetales de los que se alimenta y succionar los fotosintatos. Los estiletes en reposo se encuentran embebidos en las glándulas salivales, las cuales son las encargadas de secretarlos de nuevo, junto con el resto de la estructura bucal, tras la ecdisis (proceso de muda). Los tardígrados se alimentan de bacterias, algas, criptógamas, rotíferos, nemátodos y otros invertebrados microscópicos. Normalmente sorben sus células pero en ocasiones ingieren los organismos completos.

Buenas Tareas (2010), expone que el cuerpo de los tardígrados es corto, globoso y cilíndrico, dotado de cuatro pares de patas robustas, ventrales. Cada pata termina en cuatro a ocho uñas o discos. El cuerpo está cubierto por una cutícula lisa u ornamentada, la cual en algunas especies está dividida en placas segmentarias simétricas. La cutícula contiene quitina, mucopolisacáridos, proteínas y lípidos formando varias capas principales. La cutícula, los estiletes faríngeos, las uñas y los revestimientos del tubo digestivo son renovados periódicamente.

FIGURA1. ESTRUCTURA DE UN TARDÍGRADO



Fuente: Beltrán y Bernal, 2009

Encarta (2009), dice que su cuerpo es cilíndrico, aunque a veces algo aplastado; están provistos de cuatro pares de patas cortas no articuladas, dotadas de uñas. Estos apéndices son utilizados para desplazarse lentamente, como indica su nombre (del latín *tardus*, 'lento'; *gradus*, 'paso'), sobre el sustrato, ayudados por las uñas: esto les permite no perder el contacto con el fondo por la acción del movimiento del agua. La epidermis segrega una cutícula de naturaleza no quitinosa. Son animales chupadores, normalmente de jugos vegetales, aunque algunos se alimentan de otros animales, como rotíferos y nemátodos.

2.2.1.3 Criptobiosis

Wikipedia (2010), manifiesta que la cualidad más fascinante de los tardígrados es su capacidad, en situaciones medioambientales extremas, de entrar en estados de animación suspendida conocidos como criptobiosis. Mediante un proceso de deshidratación, pueden pasar de tener el habitual 85% de agua corporal a quedarse con tan solo un 3%. En este estado el crecimiento, la reproducción y el metabolismo se reducen o cesan temporalmente y así pueden pasar cientos, quizás miles, de años.

El mismo autor señala que a mediados de siglo XX, un científico holandés añadió agua a algunos tardígrados secos que estaban sobre la hoja de un helecho que llevaba seca en un museo desde el siglo XVII y, tras 200 años, se despertaron y continuaron su vida normalmente. Esta resistencia permite a los tardígrados sobrevivir a temporadas de frío y sequedad extremos, radiación ionizadora, calor y polución. Existen estudios que demuestran que, en estado de metabolismo indetectable, pueden sobrevivir a temperaturas que oscilan entre los -272°C y los 149°C , así como a la inmersión en alcohol puro y en éter. Científicos rusos afirman haber encontrado tardígrados vivos en la cubierta de los cohetes recién llegados de vuelta del espacio exterior.

Beltrán y Bernal (2009), mencionan que las dos características que les han dado importancia a estos animales para su estudio, son su capacidad de sobrevivir a ambientes extremos y su posición filogenética dentro de la evolución. En cuanto a la primera, cuando los tardígrados están rodeados por una película de agua permanecen activos, pero, si las condiciones ambientales cambian de manera desfavorable, pueden entrar en un estado latente conocido como criptobiosis, del cual existen varios tipos: anhidrobiosis (deseccación), criobiosis (bajas temperaturas), anoxibiosis (falta de oxígeno) u osmobiosis (cambios en la salinidad).

Encarta (2009), indica que los tardígrados terrestres tienen una capacidad singular para sobrevivir, incluso durante años, a condiciones extremas de desecación y otras condiciones adversas, reduciendo su metabolismo; esta capacidad se denomina criptobiosis.

2.2.1.4 Reproducción

Beltrán y Bernal (2009), dicen que los tardígrados poseen dos formas de reproducción: sexual considerándose como animales dioicos (con sexos separados) y por partenogénesis. Son ovíparos.

2.2.1.5 Descripción geográfica

Buenas Tareas (2010), señala que debido a que poseen una gran capacidad de adaptación a la variedad de ambientes que existen en nuestro planeta Tierra, es posible encontrarlos en cualquier parte del mundo. Desde las más grandes altitudes (6000 m.s.n.m.), hasta las más grandes profundidades (5000 m.s.n.m.).

2.2.1.6 Filogenia

Wikipedia (2010), expresa que el filo de los tardígrados se compone de tres clases: Heterotardígrados, Eutardígrados y Mesotardígrados, aunque este último taxón se basa en una sola descripción de *Thermozodium esakii* de un manantial japonés de agua caliente cerca de Nagasaki. Los especímenes y el manantial fueron destruidos por un terremoto de modo que la clase y la especie es dudosa (*nomen dubius*).

Sielfeld (2003), menciona que existen alrededor de 800 especies que viven asociados a musgos, agua dulce, suelo y el mar. En el ambiente continental habitan dos grupos característicos: orden Eutardigrada (formas blandas, nunca armadas y muy móviles) y orden Heterotardigrada (formas armadas, con numerosos apéndices y placas, poco móviles). Además un tercer orden Mesotardigrada incluye una sola familia (Thermozodiidae) con una especie: *Thermozodium esakii* conocida únicamente de aguas termales (40°C) de Japón.

2.2.2 Meloidogyne sp.

Agrios (1999), menciona que los nemátodos formadores de nódulos de la raíz se encuentran en todo el mundo. Atacan a más de 2 000 especies de plantas, incluyendo a la mayoría de las plantas cultivadas. Los nemátodos formadores de nódulos de la raíz dañan a las plantas al debilitar las puntas de la raíz y al inhibir su desarrollo o estimular una formación radical excesiva, pero principalmente al inducir a la formación de

hinchamientos en las raíces, las cuales no sólo privan a las plantas de sus nutrientes sino también deforman y disminuyen el valor comercial de muchas raíces de los cultivos.

El mismo autor indica que los nemátodos adultos macho y hembra del nódulo de la raíz son fáciles de distribuir morfológicamente. Los machos son vermiformes y miden aproximadamente de 1,2 a 1,5 mm de largo. Las hembras tienen forma de pera y un tamaño aproximado de 0,40 a 1,30 mm de largo por un ancho de 0,27 a 0,75 mm. Cada hembra deposita aproximadamente 500 huevecillos en una sustancia gelatinosa que ella misma produce.

Wikipedia (2010), señala que *Meloidogyne* es un género de nemátodos inductores de agallas que habitan en casi todas las regiones templadas y cálidas del mundo; son parásitos internos de las raíces de cientos de especies vegetales, incluyendo muchas plantas de importancia agrícola.

Cepeda (1995), dice que el género *Meloidogyne* se lo conoce como el nemátodo de los nódulos radicales; la hembra y el macho en estado larval miden 0,5 mm, la hembra madura mide 0,8 mm por 0,5 mm de ancho y tienen semejanza con las hembras de la familia *Heteroderidae*.

2.2.2.1 Ciclo Biológico

Wikipedia (2010), expresa que el ciclo biológico de los nemátodos de género *Meloidogyne*, se inicia con un huevo, dentro del cual ocurre una primera muda formándose un juvenil de segundo estadio (J2) que es el estadio infectivo, posteriormente los J2 penetran por la caliptra de la raíz y se mueven intercelularmente y se ubican muy cerca de los haces vasculares estableciendo un sitio especializado de alimentación. Al cabo de cierto tiempo ocurre una segunda, tercera y cuarta muda originándose los juveniles de tercero, cuarto estadio y adultos (hembras y machos), respectivamente. Estas etapas se diferencian por los cambios de la cutícula y por la madurez sexual.

El mismo autor enuncia, que los machos mantienen su forma vermiforme mientras que las hembras adquieren una forma globosa semejante a una pera y son consideradas endoparásitas sedentarias. La acción de las hembras durante el

establecimiento del sitio de alimentación origina cambios a nivel celular de la planta producto de la secreción de enzimas proveniente de la glándula esofágica dorsal del nematodo causando un crecimiento anormal de las células circundantes que luego se transforman en "células gigantes" multinucleadas. Estas células se caracterizan por presentar un citoplasma denso y una alta tasa metabólica. Además las especies de *Meloidogyne* parecen alterar de forma eficiente la expresión de los reguladores hormonales de la planta para maximizar y controlar la oferta de alimento.

Christie (1991), indica que las larvas recién incubadas, que se encuentran libres en los suelos, son pequeños gusanos delgados de 0,4 a 0,5 mm de longitud que se hallan en el segundo estado larvario, habiendo mudado una vez mientras estaban aún dentro del huevo. Estas larvas pueden entrar a casi cualquier parte de un vegetal que se encuentre en contacto con el suelo húmedo y en las cuales puedan hacerlo, aunque su estilete no es muy poderoso. Son parásitos sedentarios y una vez que se alojan dentro de los tejidos de la planta, no se mueven ni cambian de posición.

2.2.2.2 Síntomas

Agrios (1999), dice que los síntomas de los órganos aéreos son similares a los que producen muchas otras enfermedades de la raíz o factores del medio ambiente, los cuales disminuyen el volumen de agua disponible para la planta. Las plantas infectadas muestran un desarrollo deficiente y una menor cantidad de hojas pequeñas de color verde pálido o amarillento que tienden a marchitarse cuando el clima es cálido. Las inflorescencias y frutos no se forman o se atrofian y son de baja calidad. Las plantas afectadas a menudo sobreviven durante el transcurso de la estación de crecimiento y rara vez son destruidas prematuramente por la enfermedad.

2.2.2.3 Control

Agrios (1999), señala que el nódulo de la raíz se controla eficientemente en los invernaderos esterilizando el suelo con vapor o fumigándolo con nematicidas. El control biológico del nódulo de la raíz se ha logrado también tratando suelos infestados con nemátodos con esporas de *Bacillus (Pasteuria) penetrans*, que es un parásito obligado de algunos nematodos fitoparásitos, tratando los trasplantes o los suelos

infestados con esporas del hongo *Dactylella oviparasitica*, el cuál parasita a los huevecillos del nematodo *Meloidogyne*; y en algunos experimentos, tratando los trasplantes o los suelos infestados de nemátodos, con esporas de los hongos micorrícicos vesículo-arbusculares, *Gigaspora* y *Glomus*.

Christie (1991), menciona que hay informes dispersos de investigaciones que han observado que otros organismos destruyen a los nemátodos, o que tienen evidencia de que esto ocurre como, por ejemplo, tardígrados, oligoquetos (enquitreidos), ácaros y colémbolos.

Román y Acosta (1984), indican que el control biológico consiste en suprimir una plaga con enemigos naturales tales como depredadores y parásitos. Este método se está investigando intensivamente. En muchos ensayos se ha usado materia orgánica donde se reproducen los enemigos naturales. Algunos de estos enemigos son nematodos depredadores (*Mononchus*, *Trypila*, *Seinura*), platelmintos, tardígrados, insectos (colémbolos) y otros.

Crozzoli, expresa que los tardígrados se han observado atacando algunos nemátodos fitoparásitos. Sin embargo, su importancia como depredadores se desconoce. Algunos insectos del Orden Collembola, de los géneros *Onychirminus*, *Isotoma*, *Achorutes*, *Orchesella* y *Folsamia* han sido observados atacando quistes de Globodera. También se han observado larvas de coleópteros estafilínidos, el ácaro *Pergamasus uasipes* y un miriápodo *Litholus dubosqi* atacando quistes de Globodera.

2.2.2.4 Aislamiento

Agrios (1999), manifiesta que en general los nemátodos fitoparásitos se aíslan a partir de las raíces de las plantas que infectan o del suelo en torno a las raíces de las que se alimentan. Para su aislamiento se toma una muestra fresca del suelo aproximadamente de 100 a 300 cc, los nemátodos pueden aislarse mediante el método del embudo de Baermann o mediante tamizado. El embudo de Baermann consiste en un embudo de vidrio bastante largo (de 12 a 15 cm de diámetro), al cuál se encuentra unido un tubo de goma, con una abrazadera colocada sobre el tubo. El embudo se coloca sobre un soporte y se llena con agua. La muestra de suelo se coloca en el embudo sobre un papel

poroso y resistente a la humedad. Los nemátodos vivos se mueven activamente y migran a través del papel poroso en el agua y se sumergen hasta el fondo del tubo de goma inmediatamente por arriba del nivel donde se encuentra la abrazadera. Más del 90% de los nemátodos vivos se colecta en el primer volumen de 5 a 8 mm de agua acarreada desde el tubo de goma y esta muestra se coloca en una caja de petri para examinarla y si se desea para aislar individualmente a los nemátodos.

2.3 HIPÓTESIS

¿Los 2 ecotipos de tardígrados controlan en forma eficiente nemátodos del género *Meloidogyne sp.*, bajo condiciones de laboratorio?

2.4 VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

2.4.1 VARIABLE DEPENDIENTE

Las variables dependientes constituyen: Porcentaje de control, tipo de control, porcentaje de tardígrados activos, porcentaje de tardígrados inactivos.

2.4.2 VARIABLE INDEPENDIENTE

Constituyen los 2 ecotipos de tardígrados y la proporción tardígrado:nemátodo.

2.5 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

CUADRO 1. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tipo de Variable	Concepto	Indicador	Índice
Independiente	Ecotipos de tardígrados. Invertebrados microscópicos con cuerpo cilíndrico con cuatro pares de patas terminadas en uñas.	Ecotipo	Saquisilí Huambaló
Independiente	Proporción tardígrado: nemátodo Relación entre el número de tardígrados y nemátodos.	Proporción	1:1 2:1 1:2
Dependiente	Control del nemátodo <i>Meloidogyne sp.</i> Gusanos fitoparásitos que viven en el suelo y atacan los cultivos.	Control	Porcentaje de control (%) Tipo de control (consumido enteramente / succionado fluidos internos) Porcentaje de tardígrados activos (%) Porcentaje de tardígrados inactivos (%)

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 ENFOQUE, MODALIDAD Y TIPO INVESTIGACIÓN

Esta investigación se caracterizó por tener un enfoque cuantitativo ya que todos los datos obtenidos se pudieron contar, procesar y ordenar en el transcurso de la investigación; modalidad de laboratorio lo que quiere decir que la investigación se realizó bajo condiciones de laboratorio; y de tipo experimental debido a que se utilizaron unidades experimentales. Toda la investigación se basó en referencias bibliográficas de libros y principalmente internet.

3.2 UBICACIÓN DEL ENSAYO

Esta investigación se realizó en el Laboratorio Sanidad Vegetal de la Granja Experimental Docente Querochada de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Ambato, localizada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Sus coordenadas geográficas son 01° 22' 22" de latitud Sur, 78° 36' 22" de longitud Oeste y una altitud de 2 850 msnm. (Sistema de Posicionamiento Global, GPS).

3.3 CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

3.3.1 Clima

De acuerdo con la información registrada en la Estación Meteorológica de la Granja Experimental Docente Querochada del año 2004 al 2008 las medias son: temperatura media anual de 12,8 °C, precipitación media anual de 561,3 mm, humedad relativa media anual del 75%, evaporación suma anual de 1342,1, heliofania de 1753,9 horas/año, velocidad media diaria del viento es de 3,8 m/s.

3.3.2 Agua

El agua que se abastece el laboratorio de Sanidad Vegetal posee un contenido de sólidos totales (ST) equivalente a 246,4 mg/l, conductividad eléctrica de 385 µmhos/cm, temperatura de 14,7 °C y un valor de pH equivalente a 7,04 (neutro).

3.4 FACTORES EN ESTUDIO

3.4.1 Tardígrados

Tardígrados (localidad Saquisilí)	T1
Tardígrados (localidad Huambaló)	T2

3.4.2 Proporción

1:1 (5 tardígrados y 5 nemátodos)	P1
2:1 (10 tardígrados y 5 nemátodos)	P2
1:2 (5 tardígrados y 10 nemátodos)	P3

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó el diseño de bloques completos al azar con un arreglo factorial de 2 x 3, es decir 6 tratamientos con 3 repeticiones.

3.6 TRATAMIENTOS

CUADRO 2. TRATAMIENTOS

Número	Tratamiento	Descripción del Tratamiento
1	T1P1	Tardígrados (Saquisilí) + 1:1 (5 tardígrados : 5 nemátodos)
2	T1P2	Tardígrados (Saquisilí) + 2:1 (10 tardígrados : 5 nemátodos)
3	T1P3	Tardígrados (Saquisilí) + 1:2 (5 tardígrados : 10 nemátodos)
4	T2P1	Tardígrados (Huambaló) + 1:1 (5 tardígrados : 5 nemátodos)
5	T2P2	Tardígrados (Huambaló) + 2:1 (10 tardígrados:5 nemátodos)
6	T2P3	Tardígrados (Huambaló) + 1:2 (5 tardígrados:10 nemátodos)

3.7 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Número de unidades experimentales	:	18
Número de tratamientos	:	6
Número de repeticiones	:	3
Forma del blíster	:	Circular
Diámetro del blíster	:	1,0 cm
Altura del blíster	:	0,5 cm
Área del blíster	:	0,78 cm ²
Distancia entre tratamientos	:	1,2 cm
Distancia entre repeticiones	:	3,0 cm
Área neta del ensayo	:	14,04 cm ²
Área total del ensayo	:	306,0 cm ²

3.8 DATOS TOMADOS

3.8.1 Porcentaje de control

De cada tratamiento se sacó el porcentaje de nemátodos tragados por los tardígrados, empleando para el cálculo una regla de tres simple. Esta variable fue evaluada a los 12 días de finalizada la investigación.

3.8.2 Tipo de control

Se observó el tipo de control que los tardígrados efectuaron sobre los nemátodos, observándose que los nemátodos fueron tragados vivos. Esta variable fue evaluada a los 12 días de finalizada la investigación.

3.8.3 Porcentaje de tardígrados activos

Se determinó el porcentaje de tardígrados activos, en base al número de individuos que permanecieron activos durante la investigación, empleando para el efecto una regla de tres simple; ya que al estar expuestos a un medio diferente al de su hábitat natural algunos entraron en un estado de criptobiosis. Esta variable fue evaluada a los 12 días de finalizada la investigación.

3.8.4 Porcentaje de tardígrados inactivos

Se determinó el porcentaje de tardígrados inactivos, en base al número de individuos inactivos que se presentaron al final de la investigación, debido a las condiciones anteriormente mencionadas. Esta variable fue evaluada a los 12 días de finalizada la investigación.

3.9 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

3.9.1 Análisis Estadístico

Se efectuó el análisis de variancia (ADEVA) y la prueba de significación Tukey al 5% para las variables que resultaron significativas.

3.10 MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN

3.10.1 En campo para identificación de tardígrados

3.10.1.1 Muestreo del sustrato

Se recolectaron muestras de los sustratos en dos sitios donde mediante una investigación preliminar se encontraron tardígrados, esto se efectuó en dos localidades diferentes. El primer muestreo se realizó en la parroquia Matriz del cantón Saquisilí, provincia de Cotopaxi; mientras que el segundo muestreo se lo realizó en la parroquia Huambaló del cantón Pelileo, provincia de Tungurahua.

3.10.2 En campo para identificación de *Meloidogyne sp.*

3.10.2.1 Observación directa a simple vista

Se realizó una inspección en el cultivo de tomate hortícola (*Lycopersium esculentum*), observando la presencia de nódulos en las raíces de las plantas atacadas por el nemátodo *Meloidogyne sp.*

3.10.2.2 Muestreo de raíces y suelo

Se realizó un muestreo de las plantas atacadas por *Meloidogyne sp.*, tomando una muestra representativa de las raíces con nodulaciones y una parte de suelo cercano a las raíces atacadas por el nemátodo.

3.10.3 En el laboratorio

3.10.3.1 Observación preliminar al microscopio

Se realizó una observación preliminar de las muestras obtenidas para verificar e identificar la presencia de tardígrados así como la de nemátodos del género *Meloidogyne sp.*

3.10.3.2 Aislamiento de tardígrados

Las muestras de musgo con suelo del sector de Huambaló, fueron recolectadas en fundas plásticas para ser llevadas al laboratorio para aquí desmenuzarlas con las manos, secándolas al medio ambiente sobre un papel periódico por 24 horas, posteriormente se cernió con tamices de 850 μm , 710 μm , 600 μm , 355 μm y 300 μm , hasta obtener un suelo fino y homogéneo. Luego se colocó en un vaso pequeño de plástico una porción de suelo y se adicionó agua destilada hasta que la muestra se cubra totalmente y se dejó reposar 1 hora para hidratar el suelo y los tardígrados, seguidamente con una varilla de agitación se agitó por 20 segundos para homogenizar la solución. De la solución suelo y agua obtenida se colocó un aproximado de 2 ml en una caja petri pequeña y se observó al microscopio.

Las muestras de residuos vegetales en descomposición localizadas en los canales de agua del invernadero del sector de Saquisilí, fueron recolectadas en fundas plásticas y llevadas al laboratorio. Se depositó una pequeña muestra en un vaso plástico y se adicionó un poco de agua destilada para posteriormente agitar por 10 segundos para homogenizar la solución. De la solución obtenida se depositó un aproximado de 2 ml en una caja petri pequeña y se observó al microscopio.

El aislamiento de los tardígrados se lo realizó manualmente visualizando en el microscopio con el lente (10X), con la ayuda de una aguja de disección. En la punta de la aguja de disección se adhirió un cabello pegándolo con goma para hacerla más fina a la aguja y facilitar la extracción de los tardígrados localizados en la caja petri. Para facilitar la extracción en la punta de la aguja (cabello) se empapó de goma con lo que se adhirió al tardígrado extrayéndolo y colocándolo en un vidrio de reloj con 10 gotas de agua destilada, agitándolo para que se disuelva la goma y se desprege de la aguja. De la misma manera se extrajo del vidrio de reloj a los tardígrados de uno en uno para aplicar los tratamientos correspondientes.

3.10.3.3 Aislamiento de *Meloidogyne sp.*

Para el aislamiento de los nemátodos se utilizó una muestra fresca de suelo con *Meloidogyne sp.*, y se empleó el método del embudo de Baermann, que consiste en un embudo bastante largo (10 cm de diámetro), al cuál se une un tubo de goma, con una pinza de Hoffman colocada sobre el tubo. Dentro del embudo se coloca un trozo de papel filtro y el embudo se ubica sobre un soporte universal. Para preparar la solución, se depositó en un vaso de precipitado 300 gramos de suelo con raíces al mismo que se adicionó agua destilada hasta cubrir totalmente la muestra y con una varilla de agitación se agitó por el lapso de 3 minutos para luego colocar sobre el papel filtro que se encuentra contenido dentro del embudo y tras 24 horas de reposo de recolectó el agua filtrada con nemátodos en la manguera de caucho. Posteriormente se aflojó la pinza de Hoffman y se colectó el primer volumen de agua con nemátodos en una caja petri pequeña y se observó al microscopio, para luego aislarlos de manera individual empleando el mismo método que para tardígrados.

3.10.3.4 Aplicación de tratamientos

Se colocó en cada uno de los blíster de pastilla 1 gota de agua destilada para luego colocar los nemátodos y tardígrados según el diseño experimental planteado. Posteriormente se depositó 0,15 gramos de materia orgánica esterilizada en cada blíster y 2 gotas de agua destilada para humedecer el medio. Después de haber sido aplicado los tratamientos, los blíster de pastilla se ubicaron sobre una cartulina de color negro (18,0 cm x 18,0 cm), que fue ubicado en uno de los mesones del

laboratorio. Diariamente se revisó cada tratamiento para humedecer el medio con 1 gota de agua destilada para compensar lo perdido por evaporación y mantener el medio idóneo para la actividad de los nemátodos y tardígrados.

3.10.3.5 Pruebas de resistencia para tardígrados

3.10.3.5.1 Temperatura

De los dos ecotipos de tardígrados se seleccionó al azar dos individuos de los dos ecotipos y se los colocó en una placa porta objetos para introducirlos en la nevera de la refrigeradora a una temperatura de - 9°C, donde se los dejó reposar por el lapso de 1 hora. Luego se los sacó y se los dejó a temperatura ambiente para que se descongelen y se probó su resistencia observando en el microscopio. De igual manera se seleccionó al azar 2 individuos y se los colocó en una placa porta objetos para someterlos a 100°C por 1 minuto en la estufa. Luego de que la placa se enfrió se hidrató con 2 gotas de agua destilada y se los dejó rehidratar y probar la resistencia, esto de igual manera fue observado al microscopio.

3.10.3.5.2 Éter dietílico

De igual manera que en el caso anterior se seleccionó al azar dos individuos de los dos ecotipos y se los colocó en una placa porta objetos para añadirles 1 gota de éter dietílico, se dejó reposar por 1 hora y tras haberse evaporado el éter se extrajeron los tardígrados y se los colocó en otra placa porta objetos y se adicionó 2 gotas de agua destilada para rehidratarles y se probó la resistencia, observando al microscopio.

3.10.3.5.3 Alcohol antiséptico

Se seleccionó al azar dos individuos de los dos ecotipos y se los colocó en una placa porta objetos para añadirles 1 gota de alcohol antiséptico, se dejó reposar por 1 hora y se extrajeron los tardígrados que se los colocó en otra placa porta objetos donde se adicionó 2 gotas de agua destilada para rehidratarles y probar la resistencia, observando al microscopio.

3.10.3.5.4 Carbofurán

El Carbofurán fue disuelto según la dosis indicada para controlar nemátodos del suelo que es de 2,5 ml/l. Se seleccionó al azar 2 individuos de los dos ecotipos y se los colocó en una placa porta objetos para añadirles 1 gota de la solución. Luego de 1 hora se extrajeron los tardígrados y se los colocó en otra placa porta objetos donde se adicionó 2 gotas de agua destilada para rehidratarles y probar la resistencia, observando al microscopio.

3.10.3.5.5 pH

Se colocó en la placa porta objetos dos individuos seleccionados al azar de los dos ecotipos y se colocó soluciones con valores de pH extremadamente ácido (4,0), neutro (7,0) y fuertemente básico (10,0). Luego de 1 hora se extrajeron los tardígrados y se los colocó en otra placa porta objetos donde se adicionó 2 gotas de agua destilada para rehidratarles y probar la resistencia, observando al microscopio.

3.10.3.5.6 Formol

Se seleccionó al azar dos individuos de los dos ecotipos y se los colocó en una placa porta objetos para añadirles 1 gota de formol, se dejó reposar por 1 hora y se extrajeron los tardígrados y se los colocó en otra placa porta objetos donde se adicionó 2 gotas de agua destilada para rehidratarles y probar la resistencia, observando al microscopio.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RESULTADOS, ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DISCUSIÓN

4.1.1 Porcentaje de control

En el anexo 1, se indican los respectivos valores correspondientes al porcentaje de control de los tardígrados sobre los nemátodos del género *Meloidogyne sp.*. En el ADEVA (cuadro 3), se observa una alta significación estadística al 1% para tratamientos, tardígrados, proporción, y para la interacción tardígrados y proporción. El promedio general para esta variable es 52,22% de control de nemátodos. El coeficiente de variación es 9,03%.

CUADRO 3. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE CONTROL DEL NEMÁTODO MELOIDOGYNE SP. EN LA EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TARDÍGRADOS

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	VALOR DE F
Total	17	10711,10		
Repeticiones	2	1244,44	622,22	28,00
Tratamientos	5	9244,44	1848,88	83,20**
Tardígrados (T)	1	5688,88	5688,88	256,00**
Proporción (P)	2	2977,77	1488,88	67,00**
T vs P	2	577,77	288,88	13,00**
Error Exp.	10	222,22	22,22	

** = altamente significativo al 1%

Promedio (%) = 52,22

Coeficiente de variación = 9,03%

En la prueba de significación de Tukey al 5% (cuadro 4), para tardígrados se observa dos rangos de significación estadística. Los tratamientos en los que se encontraban los tardígrados de la localidad de Huambaló (T2), se ubican en el primer rango, reportando el mayor porcentaje de control con un promedio de 70,00%; mientras que los tratamientos en los cuales se encontraban los tardígrados de la localidad de Saquisilí (T1), reportaron

menor porcentaje de control, con un promedio de 34,44% que se ubicó en el segundo rango. Se puede deducir que se obtiene un mejor porcentaje de control de nemátodos bajo condiciones de laboratorio, con los tardígrados de la localidad de Huambaló debido a que esta especie presenta características netamente carnívoras según la literatura, a diferencia del otro ecotipo que se observó que puede sobrevivir alimentándose de pequeños microorganismos que se desarrollan en el medio.

CUADRO 4. PROMEDIOS Y DMS AL 5% PARA TARDÍGRADOS EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE CONTROL

N°	SÍMBOLO	PROMEDIO (%)	RANGO
1	T2	70,00	a
2	T1	34,44	b

Con respecto a la proporción, la prueba de Tukey al 5% (cuadro 5) en el porcentaje de control de nemátodos, se establecieron dos rangos de significación. Se obtuvo un mayor porcentaje de control en los tratamientos donde se aplicó la proporción P2 (2:1) (10 tardígrados: 5 nemátodos), con un promedio del 70,00%, ubicándolo en el primer rango. Los tratamientos de la proporción P1 (1:1) (5 tardígrados: 5 nemátodos) y la proporción P3 (1:2) (5 tardígrados: 10 nemátodos), compartieron el segundo rango con menor promedio de control de nemátodos del 46,67 % y 40,00% respectivamente.

La mejor respuesta de la proporción (P2), se debe a que el número de tardígrados presentes versus el número de nemátodos es el doble, entonces al existir un mayor número de tardígrados pueden explorar de mejor manera el medio donde se encuentran expuestos y por ende se alcanza un mayor porcentaje en el control de nemátodos.

CUADRO 5. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA PROPORCIÓN EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE CONTROL

N°	SÍMBOLO	PROMEDIO (%)	RANGO
1	P2 (2:1)	70,00	a
2	P1 (1:1)	46,67	b
3	P3 (1:2)	40,00	b

En la prueba de Tukey al 5% para la interacción tardígrados y proporción (cuadro 6), se observa cuatro rangos de significación estadística; encontrándose en el primer rango el tratamiento (T2P2) (tardígrados Huambaló + proporción 2:1), con un promedio del 93,33% de control de nemátodos. En el segundo rango se encuentra al tratamiento (T2P1) (tardígrados Huambaló + proporción 1:1), con un promedio del 66,67% de control; seguido de los tratamientos (T2P3) (tardígrados Huambaló + proporción 1:2) y (T1P3) (tardígrados Saquisilí + proporción 2:1), que compartieron el tercer rango con un promedio de 50,00% y 46,67% respectivamente. Finalmente compartiendo el cuarto rango se encuentran los tratamientos (TIP3) (tardígrados Saquisilí + proporción 1:2) y (T1P1) (tardígrados Saquisilí + proporción 1:1), con promedios del 30,00% y 26,67% de control respectivamente.

Examinado los resultados obtenidos, los tardígrados de Huambaló en proporción de dos a uno (T2P2), alcanzaron el mayor porcentaje de control debido a que esta especie carnívora al ser mucho más activos y más grandes que los de Saquisilí, pueden moverse a distintos puntos rápidamente, permitiéndoles explorar un área mayor del sustrato (materia orgánica), además el medio en el cual se encontraban expuestos en el ensayo se asemeja mucho, en lo referente a la textura del suelo, de donde se los encontró habitando; y en proporción del doble en relación con los nemátodos, facilita que al menos un tardígrado pueda encontrarse en el sustrato con un nemátodo. Esto también fue favorable ya que el sustrato estuvo siempre húmedo permitiendo mantenerse activos; no siendo así para los ejemplares de Saquisilí a los cuales se los encontró en residuos vegetales en descomposición pero con un contenido de agua superior lo que les facilitaba moverse mucho mejor.

CUADRO 6. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN TARDÍGRADOS Y PROPORCIÓN EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE CONTROL

N°	SÍMBOLO	PROMEDIO (%)	RANGO
1	T2P2	93,33	a
2	T2P1	66,67	b
3	T2P3	50,00	c
3	T1P2	46,67	c
4	T1P3	30,00	d
6	T1P1	26,67	d

4.1.2 Tipo de control

El tipo de control (cuadro 7), que los dos ecotipos de tardígrados realizaron sobre los nemátodos consistió en que fueron tragados o consumidos enteramente por medio de su aparato bucal, ya que el tamaño de los nemátodos fue inferior con relación al de los tardígrados especialmente del ecotipo Huambaló que supera en tamaño al tardígrado del ecotipo Saquisilí.

CUADRO 7. TIPO DE CONTROL DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS

N°	SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN	TIPO DE CONTROL
1	T1	Tardígrado Saquisilí	Consumidos enteramente
2	T2	Tardígrado Huambaló	Consumidos enteramente

4.1.3 Porcentaje de tardígrados activos

El anexo 2, muestra los valores correspondientes al porcentaje de tardígrados activos. En el ADEVA (cuadro 8), se observa significación estadística al 5% para tratamientos y para la interacción tardígrados vs proporción; y, ninguna significación estadística para tardígrados y proporción. El promedio general para esta variable es 76,67% de tardígrados que permanecieron activos. El coeficiente de variación es 10,38%.

CUADRO 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS ACTIVOS EN LA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE TARDÍGRADOS

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	VALOR DE F
Total	17	2800,00		
Repeticiones	2	833,33	416,67	6,58
Tratamientos	5	133,33	266,67	4,21*
Tardígrados (T)	1	0,00	0,00	0,0 ns
Proporción (P)	2	400,00	200,00	3,16ns
T vs P	2	933,33	466,66	7,37*
Error Exp.	10	633,33	63,33	

ns = no significativo

* = significativo al 5%

Promedio (%) = 76,67

Coeficiente de variación = 10,38%

En el cuadro 9, para la interacción entre tardígrados y proporción, se observa que el mejor promedio se obtuvo con la interacción T1P3 (5 tardígrados Saquisilí + 10 nemátodos) con un promedio de 86,67%, seguido de las demás interacciones que ocupan el primer y segundo rango como T1P2 (10 tardígrados Saquisilí + 5 nemátodos), con un promedio de 83,33%, T2P1 (5 tardígrados Huambaló + 5 nemátodos) con un promedio del 80,00%, T2P2 (10 tardígrados Huambaló + 5 nemátodos) con un promedio de 76,67% y la interacción T2P3 (5 tardígrados Huambaló + 10 nemátodos) con un promedio de 73,33%; mientras que ocupando el segundo rango se encuentra la interacción

T1P1 (5 tardígrados Saquisilí + 5 nemátodos) con el promedio mas bajo equivalente al 60,00% de tardígrados activos.

CUADRO 9. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN TARDÍGRADOS Y PROPORCIÓN EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS ACTIVOS

N°	SÍMBOLO	PROMEDIO (%)	RANGO
1	T1P3	86,67	a
2	T1P2	83,33	ab
3	T2P1	80,00	ab
4	T2P2	76,67	ab
5	T2P3	73,33	ab
6	T1P1	60,00	b

Los resultados obtenidos (cuadro 9), permiten inferir que el mayor porcentaje de tardígrados activos, de los dos ecotipos de tardígrados y proporciones, se obtuvo en la interacción que recibió a los tardígrados de la localidad de Saquisilí en una proporción (1:2) lo que representa 5 tardígrados y 10 nemátodos; seguido de las demás interacciones donde no existe diferencias estadísticas solo matemáticas. La interacción T1P1 obtiene el porcentaje más bajo de tardígrados activos.

4.1.4 Porcentaje de tardígrados inactivos

El anexo 3, muestra los valores correspondientes al porcentaje de tardígrados inactivos identificados durante la investigación. En el ADEVA (cuadro 10), se observa una significación estadística al 5% para tratamientos y la interacción tardígrados vs proporción y ninguna significación estadística para tardígrados y proporción. El promedio general para esta variable es 23,33% tardígrados inactivos. El coeficiente de variación es 34,11%.

CUADRO 10. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS INACTIVOS, EN LA EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE TARDÍGRADOS

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	VALOR DE F
Total	17	2800,00		
Repeticiones	2	833,33	416,67	6,58
Tratamientos	5	1333,33	266,67	4,21*
Tardígrados (T)	1	0,00	0,00	0,00ns
Proporción (P)	2	400,00	200,00	3,16ns
T vs P	2	933,33	466,67	7,37*
Error Exp.	10	633,33	66,33	

* = significativo al 1%

ns = no significativo

Promedio (%) = 23,33

Coefficiente de variación = 34,11%

Efectuando la prueba de Tukey al 5% (cuadro 11), para la interacción tardígrados y proporción determina que el menor porcentaje de tardígrados inactivos se obtiene con las interacciones T1P3 (5 tardígrados Saquisilí + 10 nemátodos) y T1P2 (10 tardígrados Saquisilí + 5 nemátodos) con promedios de 13,33% y 16,67% respectivamente ubicándose ambos en el primer rango de la prueba. Compartiendo el primer y segundo rango se encuentran las interacciones T2P1 (5 tardígrados Huambaló + 5 nemátodos) con un promedio de 20,00%, T2P2 (10 tardígrados Huambaló + 5 nemátodos) con un promedio de 23,33% y la interacción T2P3 (5 tardígrados Huambaló + 10 nemátodos) con un promedio de 26,67%. Al final de la prueba se encuentra la interacción T1P1 (5 tardígrados + 5 nemátodos) presentando el mayor promedio de 40,00% de tardígrados inactivos. Estos resultados se pueden atribuir a que los tardígrados de Saquisilí, son menos propensos a

quedarse inactivos (más resistentes) frente a los cambios del medio en el que se encuentren; a diferencia de los tardígrados de Huambaló que son más vulnerables a quedarse inactivos frente a cierto tipo de cambios en el medio.

CUADRO 11. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY AL 5% PARA LA INTERACCIÓN TARDÍGRADOS Y PROPORCIÓN EN LA VARIABLE PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS INACTIVOS

N°	SÍMBOLO	PROMEDIO (%)	RANGO
1	T1P3	13,33	a
2	T1P2	16,67	a
3	T2P1	20,00	ab
4	T2P2	23,33	ab
5	T2P3	26,67	ab
6	T1P1	40,00	b

4.1.5 Pruebas de resistencia

4.1.5.1 Temperatura

Se seleccionaron dos individuos al azar de los dos ecotipos de tardígrados, los cuales fueron sometidos a una temperatura baja de $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$, para lo cuál se empleó una nevera; mientras que para la exposición a temperaturas altas $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ se utilizó la estufa. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 12.

CUADRO 12. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

ECOTIPO DE TARDÍGRADO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO EXPOSICIÓN (horas / min.)	TIEMPO MÁXIMO DE OBSERVACIÓN (horas / min.)	TIEMPO REACCIÓN (horas / min.)
Saquisilí	- 9	1 hora	15 min.	3 min.
	100	1 min.	8 horas	No reaccionó
	90	1 min.	8 horas	No reaccionó
	80	1 min.	8 horas	No reaccionó
	70	1 min.	8 horas	No reaccionó
	60	1 min.	2 horas	2 horas
Huambaló	- 9	1 hora	15 min.	5 min.
	100	1 min.	8 horas	No reaccionó
	90	1 min.	8 horas	No reaccionó
	80	1 min.	8 horas	No reaccionó
	70	1 min.	8 horas	No reaccionó
	60	1 min.	8 horas	No reaccionó
	50	1 min.	2 horas	1 hora y 45 min.

Los resultados obtenidos para la prueba de resistencia a diferentes temperaturas (cuadro 12), permite indicar que los tardígrados del ecotipo de Saquisilí sobrevivieron al exponerlos a una temperatura de $- 9^{\circ}\text{C}$ por el lapso de 1 hora, reaccionando a los 3 minutos de exposición a la temperatura promedio del laboratorio que es de 15°C .

Por otra parte no se obtuvo resultados favorables al exponer a los tardígrados del mismo ecotipo a temperaturas de 100°C , 90°C , 80°C , 70°C por el lapso

de 1 minuto y ser observados por el lapso de 8 horas; mientras que con a una temperatura de 60 °C por 1 minuto, reaccionaron 2 horas después de haberles agregado 2 gotas de agua destilada.

Los tardígrados del ecotipo de Huambaló sobrevivieron a la exposición a una temperatura de – 9 °C por 1 hora, existiendo reacción 5 minutos más tarde; mientras que con las temperaturas de 100 °C, 90 °C, 80 °C, 70 °C, 60 °C por el lapso de 1 minuto, no existió reacción después de 8 horas de ser observados continuamente, por otra parte al exponerlos a 50 °C por 1 minuto hubo reacción después de 1 hora y 45 minutos, luego de agregarles 2 gotas de agua destilada.

4.1.5.2 Éter dietílico

Se seleccionaron dos individuos al azar de los dos ecotipos de tardígrados, a los cuales se les añadió 1 gota de éter dietílico. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 13.

CUADRO 13. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS AL ÉTER DIETÍLICO

ECOTIPO DE TARDÍGRADO	ÉTER DIETÍLICO (Gotas)	TIEMPO EXPOSICIÓN (horas)	TIEMPO MÁXIMO DE OBSERVACIÓN (horas / min.)	TIEMPO REACCIÓN (horas / min.)
Saquisilí	1	1	1 hora	25 min.
Huambaló	1	1	2 horas	1 hora y 35 min.

Los resultados obtenido para la prueba del éter dietílico (cuadro 13), se puede apreciar que los tardígrados del ecotipo de Saquisilí, tras ser expuestos a una gota

de éter dietílico durante 1 hora, existió reacción 25 minutos después de agregarle 2 gotas de agua destilada. Por otra parte los tardígrados de Huambaló reaccionaron luego de 1 hora y 35 minutos.

4.1.5.3 Alcohol antiséptico

De forma similar que en el caso anterior, se realizó una selección de dos individuos al azar de los dos ecotipos de tardígrados, a los cuales se los ubicó en una placa portaobjetos y se les añadió 1 gota de alcohol antiséptico. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 14.

CUADRO 14. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS AL ALCOHOL ANTISÉPTICO

ECOTIPO DE TARDÍGRADO	ALCOHOL ANTISÉPTICO (Gotas)	TIEMPO EXPOSICIÓN (horas)	TIEMPO MÁXIMO DE OBSERVACIÓN (horas / min.)	TIEMPO REACCIÓN (horas / min.)
Saquisilí	1	1	1 hora	32 min.
Huambaló	1	1	8 horas	No reaccionó

En el cuadro 14 se presentan los resultados para la prueba del alcohol antiséptico, donde los tardígrados del ecotipo de Saquisilí, tras añadirles 1 gota de alcohol y mantenerlos expuestos durante 1 hora, existió reacción a los 32 minutos después de agregarles 2 gotas de agua destilada. Mientras que los tardígrados del ecotipo de Huambaló, no se manifestó reacción alguna después de ser observados durante 8 horas de manera consecutiva.

4.1.5.4 Carbofurán

Para esta prueba se empleó el insecticida-nematicida carbofurán en la dosis indicada para controlar nemátodos del suelo que es de 2,5 ml/l, para lo cuál se seleccionaron dos individuos al azar de los dos ecotipos de tardígrados, a los mismos que se les añadió 1 gota de la solución preparada. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 15.

CUADRO 15. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS AL CARBOFURÁN

ECOTIPO DE TARDÍGRADO	CARBOFURÁN (Gotas)	TIEMPO EXPOSICIÓN (horas)	TIEMPO MÁXIMO DE OBSERVACIÓN (horas / min.)	TIEMPO REACCIÓN (horas / min.)
Saquisilí	1	1	8 horas	No reaccionó
Huambaló	1	1	8 horas	No reaccionó

Para la prueba de resistencia al carbofuran (cuadro 15), se observó que tras agregarle a los dos ecotipos de tardígrados 1 gota del pesticida y mantenerlos expuestos así durante 1 hora no hubo reacción de ninguno, tras ser observados durante el lapso de 8 horas.

4.1.5.5 pH

En esta prueba se empleó soluciones buffer con valores de pH conocidos, extremadamente ácido (4,0), neutro (7,0) y fuertemente básico (10,0), de igual manera que en los casos anteriores aplicó una gota de cada solución a la placa porta objetos que contenía a los tardígrados de los dos ecotipos. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 16.

CUADRO 16. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS A ESCALAS DE PH ÁCIDO, NEUTRO Y BÁSICO

ECOTIPO DE TARDÍGRADO	ESCALA DE pH	TIEMPO EXPOSICIÓN (horas)	TIEMPO MÁXIMO DE OBSERVACIÓN (horas / min.)	TIEMPO REACCIÓN (horas / min.)
Saquisilí	4,0	1	2 horas	1 hora y 5 min
	7,0	1	2 horas	No pasó nada
	10,0	1	2 horas	56 min
Huambaló	4,0	1	2 horas	1 hora y 15 min
	7,0	1	2 horas	No pasó nada
	10,0	1	2 horas	1 hora y 35 min

En el cuadro 16 se aprecian los resultados para la prueba efectuada para diferentes escalas de pH, en el cual se puede indicar que los tardígrados del ecotipo de Saquisilí, tras aplicarles 1 gota la solución buffer con valor de pH 4 (extremadamente ácido) y mantenerlos expuestos durante 1 hora, reaccionaron luego de 1 hora y 5 minutos de haberles agregado 2 gotas de agua destilada; mientras que con la solución buffer de pH 7 (neutro) no sucedió ninguna reacción en los tardígrados, por otro lado al ser expuestos a la solución buffer de pH 10 (fuertemente básico) durante 1 hora, reaccionaron luego de 56 minutos tras haberles agregado 2 gotas de agua destilada.

Para los tardígrados del ecotipo de Huambaló, los resultados fueron algo diferentes, ya que al ser expuestos a la solución de pH 4 durante 1 hora, hubo reacción luego de 1 hora y 15 minutos de adicionarles 2 gotas de agua destilada; mientras que con la solución de pH 7 no aconteció reacción alguna, por otra parte al exponerlos a la solución

de pH 10 por el lapso de 1 hora, reaccionaron después de 1 hora y 35 minutos después de agregarles 2 gotas de agua destilada.

4.1.5.6 Formol

Para esta prueba se empleó formol, para lo cual se seleccionaron dos individuos al azar de los dos ecotipos de tardígrados. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 17.

La prueba realizada con formol en los dos ecotipos de tardígrados, nos permite informar que tras aplicarles 1 gota de formol y mantenerlos expuestos por el lapso de 1 hora no existió reacción después de observarlos continuamente durante 8 horas, observándose cambios en su estructura por lo que se puede deducir que murieron.

CUADRO 17. PRUEBA DE RESISTENCIA DE LOS DOS ECOTIPOS DE TARDÍGRADOS AL FORMOL

ECOTIPO DE TARDÍGRADO	FORMOL (gotas)	TIEMPO EXPOSICIÓN (horas)	TIEMPO MÁXIMO DE OBSERVACIÓN (horas / min.)	TIEMPO REACCIÓN (horas / min.)
Saquisilí	1	1	8 horas	No reaccionó
Huambaló	1	1	8 horas	No reaccionó

4.2 VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Los resultados obtenidos con los dos ecotipos de tardígrados, en el control del nemátodo del género *Meloidogyne sp.* bajo condiciones de laboratorio, permite aceptar la hipótesis planteada determinando que los tardígrados de la localidad Huambaló (T2) ejercieron un mayor porcentaje de control sobre los nemátodos; mientras que en un menor

porcentaje lo realizaron los tardígrados de la localidad Saquisilí, además cabe destacar que influyó la proporción (2:1) de tardígrados versus nemátodos en el control de los mismos.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- A.** Los tardígrados son capaces de depredar nemátodos del género *Meloidogyne sp.*, bajo condiciones de laboratorio, pues se pudo determinar que los tardígrados de las dos localidades en estudio realizaron un control eficiente de nemátodos, presentando mejores resultados los tardígrados de la localidad Huambaló; este resultado se atribuye a que esta especie es exclusivamente carnívora puesto que en la literatura se menciona que se alimenta de nemátodos, rotíferos e inclusive tardígrados más pequeños de otras especies. Por otro lado los tardígrados de la localidad Saquisilí es una especie no descrita por la literatura, pero en esta investigación queda demostrado que también tiene una dieta de tipo carnívora aunque en menor escala, esto se puede deber a que los nemátodos de este género no están ocupando el primer lugar dentro de su dieta alimenticia o que se alimenta de otro tipo de microorganismos con los cuales se les encontró conviviendo antes de ser aislados de su hábitat.
- B.** Los tardígrados de la localidad Huambaló presentaron los mejores resultados en el control del nemátodo *Meloidogyne sp.*, bajo condiciones de laboratorio, con un promedio del 70,00 %, mientras que con los tardígrados de la localidad Saquisilí se obtuvo un menor porcentaje de control equivalente al 34,44%.
- C.** La proporción de tardígrados versus nemátodos que mejor resultado dio fue P2 (2:1), con un promedio del 70,00% de control donde el número de tardígrados fue de 10 versus la de nemátodos que fue 5 individuos.
- D.** El tipo de control que efectuaron los tardígrados de los dos ecotipos sobre los nemátodos consistió en que éstos últimos fueron consumidos o tragados completamente por los tardígrados.
- E.** La interacción que presentó el mejor porcentaje de tardígrados activos fue T1P3 (5 tardígrados Saquisilí + 10 nemátodos) con un promedio de 86,67%, mientras que el promedio más bajo se obtuvo con la interacción T1P1 (5 tardígrados Saquisilí + 5 nemátodos) con un promedio equivalente al 60,00% de tardígrados activos.

- F.** El menor porcentaje de tardígrados inactivos se mostró con las interacciones T1P3 (5 tardígrados Saquisilí + 10 nemátodos) y T1P2 (10 tardígrados Saquisilí + 5 nemátodos) con promedios de 13,33% y 16,67% respectivamente; mientras que la interacción T1P1 (5 tardígrados + 5 nemátodos) presentó el mayor promedio de 40,00% de tardígrados inactivos.
- G.** Los dos ecotipos de tardígrados pueden sobrevivir a una temperatura de $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$, existiendo tan solo variación en el tiempo de reacción. Además queda demostrado que ambos ecotipos localizados en nuestro medio no sobreviven a temperaturas consideradas entre $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero sí pueden sobrevivir a una temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el ecotipo Saquisilí y $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el ecotipo Huambaló.
- H.** Los tardígrados del ecotipo Saquisilí y Huambaló pueden sobrevivir a la exposición al éter dietílico, diferenciándose en el tiempo de reacción que fue de 25 minutos para el primer ecotipo y 1 hora con 45 minutos para el segundo ecotipo.
- I.** El ecotipo Saquisilí resistió al alcohol antiséptico, mientras que el ecotipo Huambaló que no presentó resistencia a esta sustancia.
- J.** Se determinó que los dos ecotipos de tardígrados no sobrevivieron al exponerlos al pesticida Carbofurán por lo que se concluye que los tardígrados, pueden sufrir las mismas afectaciones que los nemátodos, al entrar en contacto con el pesticida.
- K.** Ambos ecotipos de tardígrados pueden sobrevivir a valores de pH extremadamente ácidos (4,0), neutro (7,0) y fuertemente básicos (10,0), ya que no fueron afectados de ninguna manera, tan solo entraron en una etapa de inactividad debido al cambio brusco de pH del medio, pero al volverlos a un medio de agua destilada vuelven a estar activos.
- L.** Los dos ecotipos de tardígrados Saquisilí y Huambaló no resistieron a la exposición al formol, observándose cambios en su estructura, por lo que se puede afirmar que esta sustancia causó la muerte de los tardígrados.

M. El ecotipo encontrado en Huambaló, basados en las claves para los órdenes citados por la literatura, pertenece al orden Eutardigrada, familia Milnesiidae, género *Milnesium*, especie *Milnesium tardigradum*. Mientras que el ecotipo Saquisilí pertenece al orden Eutardigrada, pero se desconoce el género debido a que no se encuentran coincidencias con las claves descritas en la literatura.

5.2 RECOMENDACIONES

- A.** Realizar nuevas investigaciones para encontrar e identificar en nuestro medio otras especies de tardígrados carnívoros, que pueda dar mejores resultados en el control de nemátodos que la especie *Milnesium tardigradum* localizada en Huambaló.
- B.** Continuar la investigación basada en los antecedentes que se tiene en condiciones de laboratorio, pasar a lo que es campo para probar su eficiencia controlando nemátodos directamente en el suelo.
- C.** Indagar en otras alternativas de control a partir de tardígrados en otros géneros nemátodos que causan graves daños a varios cultivos como es el caso del nemátodo formador de quistes (*Heterodera sp.* y *Globodera sp.*), nemátodo lesionador (*Pratylenchus sp.*), nemátodo del bulbo y tallo (*Ditylenchus sp.*), entre los más conocidos de nuestro medio.
- D.** Buscar otros métodos de extracción de tardígrados, que faciliten aislar grandes poblaciones para continuar investigando con estos microorganismos que son poco o nada conocidos en nuestro medio y las funciones que cumplen en nuestro ecosistema.
- E.** Investigar sobre métodos que permitan la proliferación de los tardígrados en condiciones de laboratorio, con el antecedente de que en la presente investigación realizada se pudo aislar madres conteniendo entre 5 y 8 huevos que eclosionaron con éxito. Esto permitirá tener un mayor número de tardígrados que puedan ser empleados en la continuación de ésta u otras investigaciones que vayan en beneficio de la agricultura de nuestro medio.

- F.** Aislar tardígrados de forma preliminar y directa, desmenuzando el musgo fresco en un vaso plástico, adicionándole agua destilada y posteriormente agitar por pocos segundos y observar al microscopio, con esto se tiene buenos resultados en la búsqueda de tardígrados ya sea en el mismo o en otros sustratos.
- G.** En la extracción de tardígrados de la solución también se puede emplear harina disuelta en agua (engrudo), esto al ser un producto natural no produce efectos dañinos sobre los tardígrados, ya que la goma que en esta investigación fue utilizada es más eficaz pero si se los deja mucho tiempo expuestos a la misma, los tardígrados tienden a quedar mucho tiempo inactivos.
- H.** Hidratar las muestras de musgo recolectadas consecutivamente para mantenerlas húmedas y ubicarlas en un lugar cercano a la luz solar ya que de no darse principalmente el primer factor, tienden a quedarse inactivos y es más difícil su búsqueda al microscopio, esto lógicamente se daría para búsquedas preliminares de nuevas especies o la misma en el sustrato ya encontrado, debido a que no todos los musgos investigados contienen tardígrados.
- I.** Realizar búsquedas de tardígrados en sustratos húmedos como por ejemplo las composteras en donde se pudo encontrar tardígrados pero su número era demasiado bajo por lo que no se los pudo emplear en la presente investigación.
- J.** Procurar que los tardígrados aislados, en este caso terrestres, no permanezcan demasiado tiempo sumergidos en agua pura, sino que se los ubique en un sustrato que permita retener humedad y uno bueno es la materia orgánica, además de que permanezcan con solo películas finas de agua para mantenerlos activos, ya que de lo contrario pueden llegar a morir por ser especies terrestres. Lo que se puede hacer es privarles completamente de agua para permitirles entrar en inactividad o criptobiosis y mantenerles almacenados por mucho tiempo.

VI. PROPUESTA

6.1 TÍTULO

Evaluación de la eficacia del tardígrado (*Milnesium tardigradum*) en el control del nemátodo del quiste (*Globodera sp.*) y el nemátodo lesionador (*Pratylenchus sp.*) bajo condiciones de laboratorio.

6.2 FUNDAMENTACIÓN

Greco (2008), expresa que aunque la población de nemátodos no se incrementa tan rápidamente como sucede con los hongos o bacterias patógenos de la papa, una vez que se encuentre bien establecido en las áreas de cultivo son, aún con la tecnología moderna, imposibles de erradicar. Las condiciones ambientales que aseguran el éxito de un cultivo comercial de papa, proporcionan también las condiciones óptimas para la multiplicación y supervivencia de estos nematodos.

CABI (2000), menciona que el nemátodo formador del quiste (*Globodera sp.*), no causan síntomas específicos en la parte aérea de la planta que puedan tener valor para diagnóstico, pero los daños causados en las raíces hacen que la planta afectada muestre síntomas similares a los provocados por deficiencia de agua o de elementos minerales. En el cultivo se pueden observar generalmente parches de pobre crecimiento con amarillamiento del follaje presentándose bajo condiciones de sequía, una severa marchitez del mismo. Una alta población de nematodos detiene el desarrollo de la planta y causa su muerte prematura, presentándose además una proliferación de raíces laterales.

CABI (2000), indica que la papa (*Solanum tuberosum*) es el más importante hospedero del nemátodo del quiste, aunque el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y la berengena (*Solanum melonogena*) pueden ser afectados. En estudios realizados sobre el rango de hospederos se han determinado alrededor de 90 especies de *Solanum* como potenciales hospederos del nemátodo del quiste.

Agrios (1999), manifiesta que el nemátodo lesionador (*Pratylenchus sp.*) se encuentra en todas partes del mundo, donde ataca a las raíces de todas las clases de plantas, como es

el caso de los cultivos del campo, os cultivos de cereales, cultivos de hortalizas, árboles frutales y muchas plantas de ornato. Las plantas herbáceas hospedantes susceptibles que son afectadas por el nemátodo lesionador quedan achaparradas y muestran clorosis, como si estuvieran sufriendo deficiencias minerales o falta de agua.

El presente ensayo se fundamenta en los resultados obtenidos al evaluar la eficacia de tardígrados en el control del nemátodo *Meloidogyne sp.*, bajo condiciones de laboratorio, a partir de tardígrados aislados de dos sustratos y nemátodos aislados de muestras de raíces de tomate hortícola (*Lycopersicon esculentum*) atacadas por *Meloidogyne*, donde se obtuvo el mejor porcentaje de control (70,00 %) empleando tardígrados del ecotipo Huambaló que se describe como la especie (*Milnesium tardigradum*).

6.3 OBJETIVOS

6.3.1 Objetivo General

Evaluar la eficacia del tardígrado (*Milnesium tardigradum*) en el control del nemátodo del quiste (*Globodera sp.*) y el nemátodo lesionador (*Pratylenchus sp.*) a fin de disminuir la población de los mismos bajo condiciones de laboratorio.

6.3.2 Objetivos Específicos

Buscar métodos que faciliten la proliferación de los tardígrados bajo condiciones de laboratorio.

Determinar el control del nemátodo del quiste (*Globodera sp.*) y el nemátodo lesionador (*Pratylenchus sp.*), por acción de los tardígrados en condiciones de laboratorio.

6.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Los nematodos del quiste (*Globodera sp.*) de la papa son considerados como la plaga más importante del cultivo de la papa en las áreas de clima frío y templado. El efecto sobre el rendimiento varía de acuerdo a la densidad de nematodos presentes en el suelo, de ser

alta puede ser la causa de un completo fracaso en el cultivo. Puede también incrementar la susceptibilidad a la marchitez causada por *Verticillium alboatrum*.

La falta de cultivares comerciales disponibles resistentes al nematodo hacen difícil llevar a cabo un buen control. El daño causado, principalmente referido al peso de los tubérculos, esta muy relacionado al número de huevos de nematodo por unidad de suelo; se estima que aproximadamente 2 t/ha de papa se pierden por cada 20 huevos/g de suelo. Arriba del 80% de pérdida de cultivo se puede alcanzar cuando la población de nematodos alcanza niveles altos en cultivos sin rotación.

El nemátodo lesionador (*Pratylenchus sp.*) causa serios daños en las raíces de las plantas que consiste en una reduccción o inhibición de su raíz por la formación de lesiones locales en las raíces jóvenes, que se producen antes de que los hongos y bacterias secundarios ocasionen pudrición. Debido a los daños que sufre la raíz, las plantas afectadas muestran un crecimiento deficiente, dan poco rendimiento y finalmente mueren.

6.5 PROPUESTA

Para llevar a cabo la propuesta de investigación es necesario puntualizar los siguientes datos técnicos:

6.5.1 Factores en estudio

6.5.1.1 Nemátodos

Nemátodo del quiste (<i>Globodera sp</i>)	N1
Nemátodo lesionador (<i>Pratylenchus sp.</i>)	N2

6.5.1.2 Sustratos

Materia orgánica	S1
Arena fina	S2

6.5.1.3 Proporción

1:1 (10:10)

P1

2:1 (20:10)

P2

6.5.2 Diseño experimental

Se empleará el diseño de bloques completos al azar con un arreglo factorial de 2 x 2 x 2, es decir 8 tratamientos con 4 repeticiones.

6.5.3 Tratamientos

CUADRO 18. TRATAMIENTOS

Nº	Tratamiento	Descripción del Tratamiento
1	N1S1P1	<i>Globodera</i> + Materia orgánica + 1:1 (10 tardígrados :10 nemátodos)
2	N1S1P2	<i>Globodera</i> + Materia orgánica + 2:1 (20 tardígrados :10 nemátodos)
3	N1S2P1	<i>Globodera</i> + Arena fina + 1:1 (10 tardígrados : 10 nemátodos)
4	N1S2P2	<i>Globodera</i> + Arena fina + 2:1 (20 tardígrados : 10 nemátodos)
5	N2S1P1	<i>Pratylenchus</i> + Materia orgánica + 1:1 (10 tardígrados :10 nemátodos)
6	N2S1P2	<i>Pratylenchus</i> + Materia orgánica + 2:1 (20 tardígrados :10 nemátodos)
7	N2S2P1	<i>Pratylenchus sp.</i> + Arena fina + 1:1 (10 tardígrados : 10 nemátodos)
8	N2S2P2	<i>Pratylenchus sp.</i> + Arena fina + 2:1 (20 tardígrados : 10 nemátodos)

6.5.4 Análisis estadístico

Se efectuará el análisis de variancia (ADEVA) y la prueba de significación de Tukey al 5% para las variables que resultaren significativas.

6.5.5 Datos por tomar

6.5.5.1 Porcentaje de control

6.5.5.2 Tipo de control

6.5.5.3 Número de tardígrados activos

6.5.5.4 Número de tardígrados inactivos

6.6 IMPLEMENTACIÓN

6.6.1 En campo para identificación de tardígrados

6.6.1.1 Muestreo del sustrato

Se recolectarán muestras de sustratos (musgos) para realizar una búsqueda preliminar de tardígrados.

6.6.2 En campo para identificar Globodera sp.

6.6.2.1 Observación directa simple vista

Se realizará una inspección en las raíces de los cultivos de papa para el caso del nemátodo del quiste, mientras que para el nemátodo lesionador se lo hará en hortalizas o cereales.

6.6.2.2 Muestreo de raíces y suelo

Se realizará un muestreo de las plantas atacadas por *Globodera sp.* y *Pratylenchus sp.*, tomando una muestra representativa de las raíces y una parte de suelo cercano a las raíces atacadas por el nemátodo.

6.6.3 En el laboratorio

6.6.3.1 Observación preliminar al microscopio

Se realizará una observación preliminar de las muestras obtenidas para verificar e identificar la presencia de tardígrados así como la de nemátodos de ambos géneros.

6.6.3.2 Aislamiento de tardígrados

Las muestras de musgo con suelo, serán recolectadas en fundas plásticas para ser llevadas al laboratorio para aquí desmenuzarlas con las manos, secándolas al medio ambiente sobre un papel periódico por 24 horas, luego se cernirá con tamices de 850 μm , 710 μm , 600 μm , 355 μm y 300 μm , hasta obtener un suelo fino y homogéneo. Luego se colocará en un vaso pequeño de plástico una porción de suelo y se adicionará agua destilada hasta que la muestra se cubra totalmente y se dejará reposar entre 1 y 2 horas para que se hidrate el suelo y los tardígrados, posteriormente con una varilla de agitación se agitará por 20 segundos para homogenizar la solución. De la solución suelo-agua obtenido se colocará un aproximado de 2 ml en una caja petri pequeña y se observará al microscopio.

El aislamiento de los tardígrados se lo realizará manualmente visualizando en el microscopio con el lente (10X), con la ayuda de una aguja de disección. En la punta de la aguja de disección se adherirá un cabello pegándolo con goma para hacerla más fina y facilitar la extracción de los tardígrados localizados en la caja petri. Para facilitar la extracción en la punta de la aguja (cabello) se empapará de goma con lo que se adherirá al tardígrado extrayéndolo y colocándolo en un vidrio de reloj con 10 gotas de agua destilada, agitándolo para que se disuelva la goma y se despegue de la aguja. De la misma manera se extraerá del vidrio de reloj a los tardígrados de uno en uno para aplicar los tratamientos correspondientes.

6.6.3.3 Aislamiento de *Globodera sp.* y *Pratylenchus sp.*

Para el aislamiento del nemátodo del quiste se empleará el

método de la coca cola para lo cuál se necesitan: 50 ml de suelo, botella transparente de pico angosto, papel filtro, caja petri y aguja de disección. El procedimiento consiste colocar 50 gr de suelo seco en la botella, luego agregar agua hasta la mitad de la botella y agitar bien. Posteriormente llenar con agua hasta 1 cm del pico. Luego transferir los quistes y la materia orgánica que han flotado en el pico al papel filtro rayado en líneas o en cuadritos para contar los quistes bajo el microscopio de disección y extraerlos individualmente.

Para el aislamiento del nemátodo lesionador se utilizará una muestra fresca de suelo con raíces y se empleará el método del embudo de Baermann. Para preparar la solución se depositará en un vaso de precipitado 300 gramos de suelo con raíces al mismo que se adicionará agua destilada hasta cubrir totalmente la muestra y con una varilla de agitación se agitará por el lapso de 3 minutos para posteriormente colocar sobre el papel filtro que se encuentra contenido dentro del embudo y tras 24 horas de reposo de recolectará el agua filtrada con nemátodos en la manguera de caucho. Posteriormente se aflojará la pinza de Hoffman y se colectará el primer volumen de agua con nemátodos en una caja petri pequeña y se observará al microscopio, para luego aislarlos.

6.6.3.4 Aplicación de tratamientos

Se colocará en cada uno de los blíster de pastilla 1 gota de agua destilada para luego colocar los nemátodos y tardígrados según el diseño experimental planteado. Posteriormente se depositará 0,15 gramos de materia orgánica esterilizada en cada blíster y 2 gotas de agua destilada para humedecer el medio Después de haber sido aplicado los tratamientos, los blíster de pastilla se ubicarán sobre una cartulina de color negro para luego ubicarlo en uno de lo mesones del laboratorio. Diariamente se revisará cada tratamiento, para en caso de ser necesario humedecer el medio con 1 gota de agua destilada para compensar lo perdido por evaporación y mantener el medio idóneo para la actividad de los nemátodos y tardígrados.

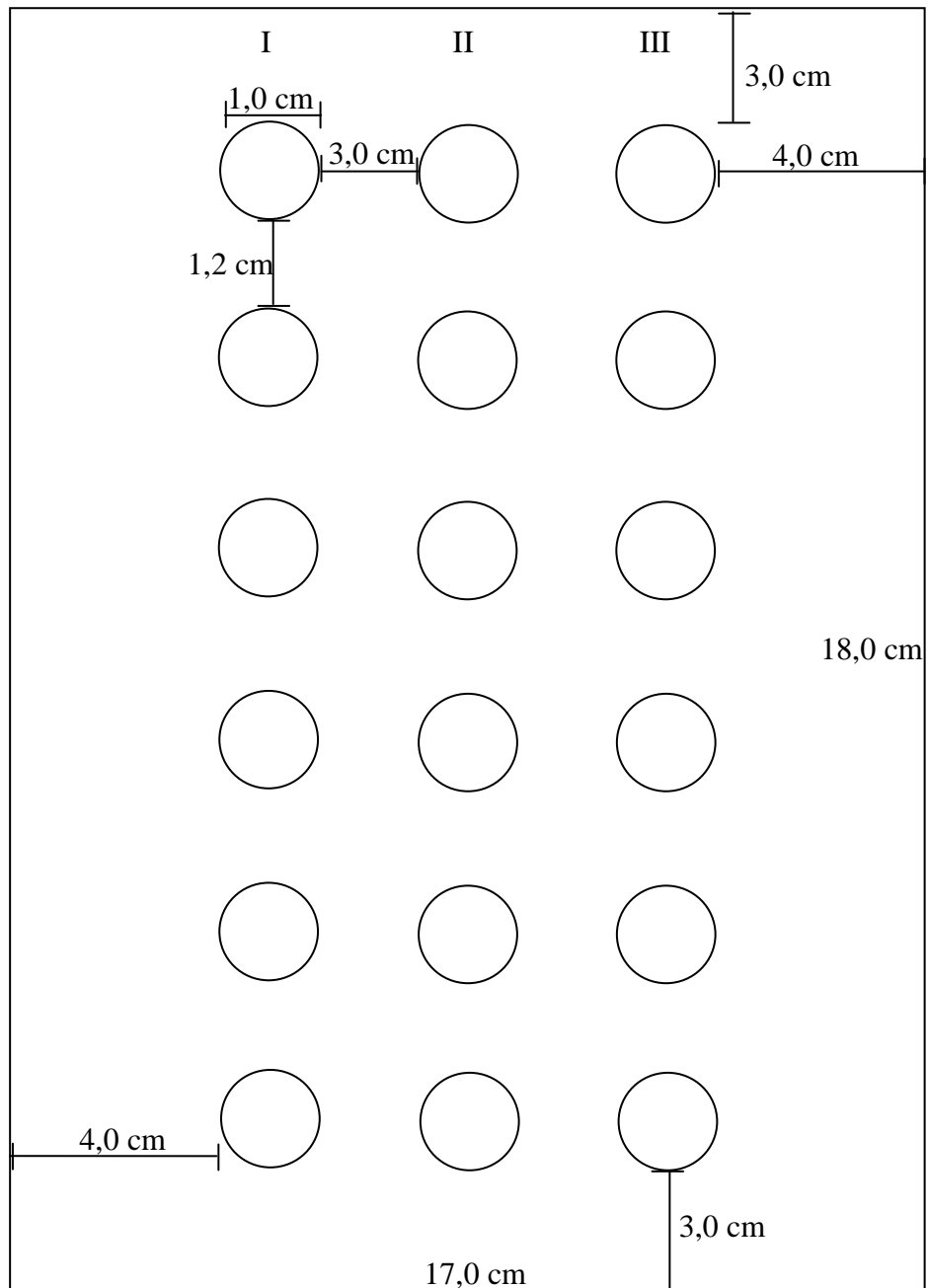
VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, 1999. Fitopatología. Limusa 2 ed. México 838 p.
2. Beltrán, E.; Bernal, J. 2009. Acercamiento a los estudios actuales sobre el filo Tardigrada y su importancia en la medicina (en línea). Consultado el 29 de Abril 2010. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Medicina/publi/universitas/serial/v50n3/10-ACERCAMIENTO.pdf>
3. Buenas Tareas, 2010. Filum Tardigrada (en línea). Consultado el 06 de Abril 2010. Disponible en <http://www.buenastareas.com/ensayos/Filum-Tardigrada/70159>
4. CABI, 2000. Crop Protection Compendium. Global Module. 2 ed. CAB International. 1 disco compacto 75 min
5. Cepeda, M. 1995. Prácticas de nematología agrícola. Trillas. México 109 p.
6. Christie, J. 1991. Nemátodos de los vegetales su ecología y control. Limusa México 275 p.
7. Crozzoli, R. Nematodos (en línea). Consultado el 06 de abril 2010. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/339/33907004.pdf>
8. Encarta, 2009. Tardígrados. Microsoft® Student. Microsoft Corporation.
9. Greco, N. 2009 Globodera, ficha técnica para análisis de riesgo. Consultado el 28 de Julio del 2010. Disponible en <http://www.arrakis.es/nematodos/articulos>
10. Jerez, J.; Narváez, E. 2001. Tardígrados (Animalia: Tardigrada) de la Reserva El Diviso – Santander, Colombia (en línea). Consultado el 06 de Abril 2010. Disponible en <http://www.siac.net.co/biota/bitstream/123456789/91/1>
11. Román, J.; Acosta, N. 1984. Nemátodos diagnóstico y combate (en línea). Consultado el 06 de Abril 2010. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos47/manejo-plagas/manejo-plagas3.shtml>
12. Romero, J.; Silva, M. ;Adabache, A. ;Mondragón, D. 2009. Tardígrados habitantes de un bosque templado de montaña, estudio preliminar (en línea). Consultado el 06 de Abril 2010. Disponible en <http://www.uv.mx/inbioteca/inst/documents/11CE.pdf>
13. Sielfeld, W. 2003. Clase Tardigrada. Guías de identificación y biodiversidad Fauna Chilena. Apuntes de Zoología, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile (en línea). Consultado el 06 de Abril 2010. Disponible en http://www.unap.cl/csmar/BioDiv1_archivos/TARDIGRADA.pdf

14. Wikipedia, 2010. Tardígrados (en línea) Consultado el 06 de Abril 2010.
Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Tardigrada>

VII. APÉNDICE

FIGURA 2. CROQUIS DEL ENSAYO



ANEXO 1. PORCENTAJE DE CONTROL

N°	Tratamiento	Repeticiones			Total	Promedio
		I	II	III		
1	T1P1	20,0	40,0	20,0	80,0	26,67
2	T1P2	40,0	60,0	40,0	140,0	46,67
3	T1P3	30,0	40,0	20,0	90,0	30,00
4	T2P1	60,0	80,0	60,0	200,0	66,67
5	T2P2	100,0	100,0	80,0	280,0	93,33
6	T2P3	50,0	60,0	40,0	150,0	50,00

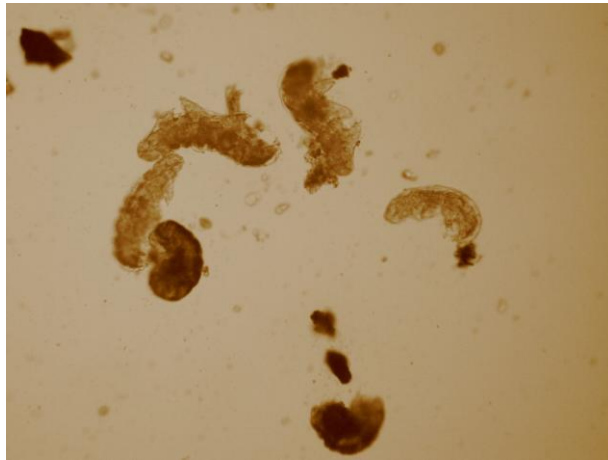
ANEXO 2. PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS ACTIVOS

N°	Tratamiento	Repeticiones			Total	Promedio
		I	II	III		
1	T1P1	60,0	80,0	40,0	180,0	60,00
2	T1P2	80,0	90,0	80,0	250,0	83,33
3	T1P3	80,0	100,0	80,0	260,0	86,67
4	T2P1	80,0	80,0	80,0	240,0	80,00
5	T2P2	80,0	80,0	70,0	230,0	76,67
6	T2P3	80,0	80,0	60,0	220,0	73,33

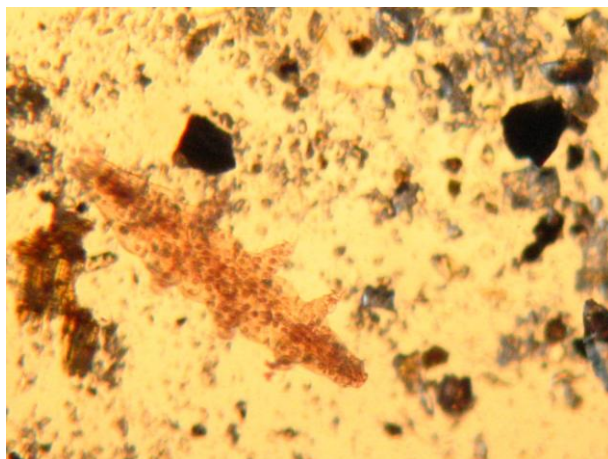
ANEXO 3. PORCENTAJE DE TARDÍGRADOS INACTIVOS

N°	Tratamiento	Repeticiones			Total	Promedio
		I	II	III		
1	T1P1	40,0	20,0	60,0	120,0	40,00
2	T1P2	20,0	10,0	20,0	50,0	16,67
3	T1P3	20,0	0,0	20,0	40,0	13,33
4	T2P1	20,0	20,0	20,0	60,0	20,00
5	T2P2	20,0	20,0	30,0	70,0	23,33
6	T2P3	20,0	20,0	40,0	80,0	26,67

ANEXO 4. TARDÍGRADOS ECOTIPO HUAMBALÓ Y SAQUISILÍ



ANEXO 5. TARDÍGRADOS EN ESTADO DE CRIPTOBIOSIS



ANEXO 6. HUEVECILLOS DE TARDÍGRADO POR ECLOSIONAR



ANEXO 7. ECLOSIÓN DE UN TARDÍGRADO

