



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE

**“ACTIVIDAD HERBICIDA DE EXTRACTOS DE HONGOS DE
SUELO DE LA SIERRA SUR DEL ECUADOR EN SEMILLAS
DE MALEZAS”**

**TRABAJO DE GRADUACION PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE BIÓLOGO**

AUTOR:
LUIS EDUARDO CARDENAS PASATO

DIRECTOR:
ING. AÍDA CAZAR RAMIREZ

CUENCA, ECUADOR
2008

DEDICATORIA

A todos los que luchan por los que no tienen voz y sufren el maltrato del ser humano.

A María Alicia y Luis Antonio por dejarme soñar y tener el valor de luchar con la senda que su hijo escogió caminar.

Luis Eduardo

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación se la realizó gracias al apoyo y colaboración de: Ing. Aída Cazar, Dra. Maria Elena Cazar, Magíster Pablo Menendez.

RESUMEN

La presente investigación evalúa la actividad biológica de metabolitos secundarios de hongos de suelo, como biocontroladores de semillas de malezas. Se realizaron cinco ensayos evaluando su actividad fitotóxica frente a semillas de trigo, lechuga y maleza en concentraciones de 500 ug/ml y 1000 ug/ml para ensayos pre y pos emergente del crecimiento del epicotilo. El extracto H1 es aquel que inhibe el crecimiento del epicotilo en un 66.66% de todo el bioensayo siendo el metabolito secundario de mayor fitotoxicidad. Los extractos analizados no presentan selectividad en la germinación de semillas. La actividad herbicida inhibe el crecimiento tanto de cultivos como de malezas.

ABSTRACT

In the present work, the biological activity of secondary metabolites from soil fungi was evaluated. The target was the further use as biocontrol agent of weeds seeds. Five essays to evaluate the phytotoxic activity were performed. Seeds for wheat, lettuce and wild weeds were used. The extracts obtained from soil-state fermented fungi were diluted in a concentration range from 500 ug/ml to 1000 ug/ml, to evaluate the pre and post emergent effect expressed as epicotyl growth. The crude extract from H1 fungus inhibit the epicotyl growth in the all the species tested (66.66% effect), being the extract with the highest bioactivity. The extracts tested were no selective to inhibit weeds growth. The herbicide activity was displayed towards seeds from agricultural crops and weeds as well.

OBJETIVOS GENERAL

Aislar cepas fungales provenientes de muestras de suelo colectadas en ecosistemas agrícolas y no antropizados del sur ecuatoriano y probar la efectividad de sus extractos orgánicos como biocontrolador en semillas de malezas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Formar una colección de al menos quince hongos de suelo aislados de ecosistemas del sur del país.

Cultivar los aislados obtenidos en medio sólido utilizando sustratos asequibles y de bajo costo.

Probar la actividad inhibitoria de germinación y crecimiento de semillas de los extractos obtenidos a partir de cultivos sólidos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Contenido	Pág.
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Objetivos.....	vi
Índice.....	vii

Introducción

Perfil del sector agropecuario ecuatoriano.....	1
Problemas de la agricultura en el Ecuador.....	2

Capítulo 1: Marco Teórico

1.1 Las Malezas.....	4
1.2 Competencias e interacciones de las malezas con las plantas cultivadas	4
1.2.1 Competencia por el espacio útil	5
1.2.2 Competencia por la luz.....	5
1.2.3 Competencia por el agua	5
1.2.4 Competencia por elementos nutritivos.....	5
1.2.5 Interrelaciones entre malezas y plantas cultivadas.....	6
1.3 Relación con plagas y enfermedades.....	6
1.4 Características biológicas de las malezas.....	7
1.4.1 Fácil de dispersión.....	7
1.4.2 Elevada capacidad de persistencia	7
1.4.3 Alta capacidad de competencia.....	7
1.5 Clasificación de las malezas.....	8
1.5.1 Ciclo Vegetativo	8
1.5.2 Ciclo Biológico	8
1.5.3 Morfología en relación con la acción herbicida.....	8
1.5.4 Hábitat.....	9
1.5.5 Biotopos que invaden.....	9

1.6 Métodos de control de las malezas.....	9
1.6.1 Control químico.....	10
1.7 Herbicidas.....	11
1.8 Detoxificación de los herbicidas y tolerancia.....	12
1.9 Resistencia de las malezas a los herbicidas.....	12
1.10 Mecanismos de resistencia.....	12
1.11 Prevención y manejo de la resistencia a los herbicidas.....	13
1.12 Manejo de poblaciones de malezas naturalmente resistentes.....	14
a los herbicidas.....	14
1.13 Alternativas al uso de herbicidas para el control de malezas.....	15
1.14 Metabolitos Bioactivos de Hongos de Suelo.....	15
1.15 Los Micoherbicidas.....	16

Capítulo 2: Metodología

2.1 Materiales.....	18
2.1.1 Solventes, reactivos químicos y suplementos para medios de cultivo.....	18
2.1.2 Medios de Cultivo: Composición.....	18
2.1.3 Semillas para ensayos de fitotoxicidad.....	19
2.2 Métodos.....	19
2.2.1 Zonas de Muestreo.....	19
2.2.2 Recolección de las muestras de suelo.....	19
2.2.3 Aislamiento de hongos de suelo.....	19
2.2.4 Cultivo sólido de aislados fungales y obtención de extractos.....	20
2.2.5 Pruebas de germinación.....	20
2.2.6 Fitotoxicidad.....	21

Capítulo 3: Resultados y Discusiones

3.1 Resultados.....	22
3.1.1 Obtención de muestras y aislados fungales.....	22
3.1.2 Rendimiento de los metabolitos secundarios.....	22
3.1.3 Porcentaje de germinación.....	23
3.1.4 Pruebas de fitotoxicidad.....	23
3.1.5 Fitotoxicidad en semillas de <i>Lactuca sativa</i> L., <i>Triticum aestivum</i> L., <i>Rumex crispus</i> L.	23

3.1.6 Resultados generales.....	31
3.2 Discusiones.....	34
3.2.1 Fitotoxicidad en semillas de Lechuga, trigo y maleza.....	34
Conclusiones y Recomendaciones.....	39
Bibliografía.....	41
Anexos.....	46

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y CUADROS

Cuadro 3.1 Localidades de recolección de muestras de suelo para la obtención de aislados fungales.....	26
Cuadro 3.2. Rendimiento en gramos de los extractos crudos a partir de fermentación sólida.....	27
Gráfico 3.1 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. para extractos a una concentración de [1000 ug/ml].....	28
Gráfico 3.2 Comparación de la media aritmética de la actividad inhibitoria de los extractos en semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. a una concentración de [500 ug/ml]....	29
Gráfico 3.3 Comparación de la media aritmética de la actividad inhibitoria de los extractos en semillas de <i>Triticum aestivum</i> L. a una concentración de [1000 ug/ml].....	29
Gráfico 3.4 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de <i>Rumex crispus</i> L. para extractos a una concentración de [500 ug/ml].....	30
Gráfico 3.5 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. para extractos a una concentración de [500 ug/ml].....	31
Gráfico 3.6 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i> L. para extractos a una concentración de [1000 ug/ml].....	32
Gráfico 3.7 Comparación de la media aritmética de la actividad inhibitoria de los extractos en semillas de <i>Triticum aestivum</i> L. a una concentración de [1000 ug/ml].....	33
Gráfico 3.8 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de <i>Triticum aestivum</i> L. para extractos a una concentración de [1000 ug/ml].....	33
Gráfico 3.9 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de <i>Rumex crispus</i> L. para extractos a una concentración de [500 ug/ml].....	34
Gráfico 3.10 Porcentaje de Fitotoxicidad de los extractos evaluados en los bio ensayos.....	35
Gráfico 3.11 Actividad fitotóxica pre emergente en la germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i> L., <i>Triticum aestivum</i> L., <i>Rumex crispus</i> L.....	36
Gráfico 3.12 Actividad fitotóxica pos emergente en la germinación de semillas de <i>Lactuca sativa</i> L., <i>Triticum aestivum</i> L., <i>Rumex crispus</i> L.....	38
Gráfico 3.13 Actividad fitotóxica pre y pos emergente en la germinación de semillas de lechuga, trigo y maleza.....	39

Cárdenas Pasato Luis Eduardo
Trabajo de Graduación
Ing. Aída Cazar Ramirez
marzo de 2008

ACTIVIDAD HERBICIDA DE EXTRACTOS DE HONGOS DE SUELO DE LA SIERRA SUR DEL ECUADOR EN SEMILLAS DE MALEZAS

INTRODUCCIÓN

Perfil del sector agropecuario ecuatoriano

El Ecuador es un país eminentemente agrícola y su importancia radica, tanto en su contribución a la economía nacional, como en la dinámica social que la economía campesina descubre en esta actividad económica.

El peso del sector agropecuario se visualiza más claramente si se considera la contribución del sector a la economía, su importancia en la generación de divisas, los encadenamientos productivos hacia atrás y hacia delante, que tiene con otros sectores de la economía, así como su importancia en cuanto a la generación de empleo.

Así, la contribución, en términos reales de la agricultura ecuatoriana a nivel primario en la economía nacional durante el período 1996-2002 fue de 17.4%, mayor que la del resto de sectores. Esto hace que se convierta en el sector más importante de la economía ecuatoriana, por encima del sector de petróleo y minas, sector manufacturero, comercio y hoteles, es decir que su importancia sigue estando vigente, ya que de cada cinco dólares que genera el país, dos se originan en el sector agropecuario, por lo que en los procesos de integración de mercados la inversión se focaliza hacia el mejoramiento de la calidad, la diversidad y de la productividad.

Según el último Censo Nacional Agropecuario (2002), los cultivos que, a nivel nacional, aportaron con mayor volumen a la producción, y por ende contribuyeron

con un peso importante en la formación del PIB agropecuario fueron: banano, caña de azúcar, arroz, palma africana, maíz duro seco, plátano, papa, naranja, soya, palmito, yuca y mango (Vallejo, 2002).

Siendo la agricultura una de las actividades más importantes, se plantea el reto de mejorar la forma en que se contabiliza el aporte de la agricultura al desarrollo económico, sobre todo en la conservación del ambiente, el alivio a la pobreza, la seguridad y soberanía alimentaria y como fuente de nuevas formas de energía.

Los sistemas que existen alrededor de la agricultura, sobre todo su relación con el medio ambiente, la industria, las finanzas, el comercio y los consumidores, se han vuelto más complejos, lo cual exige nuevas herramientas de política y nuevos paradigmas para atender adecuadamente las necesidades de seguridad alimentaria del siglo 21 (Arias *et al.*, 2005).

Problemas de la Agricultura en el Ecuador

Siendo la agricultura una de las actividades más importantes no ha alcanzado buenos niveles de producción debido a las malas prácticas agrícolas y el uso excesivo de químicos tradicionales, que han producido impactos sobre el ambiente y la cadena trófica de los ecosistemas, bioacumulándose en los organismos con efectos mutacionales y cancerígenos (Derache, 1990).

El uso de herbicidas es un importante componente de la producción agrícola mundial, los agricultores se apoyan cada vez más en el control químico. La continua aplicación de herbicidas para controlar las malezas a producido la resistencia, de las malezas, a los herbicidas; produciendo que éstas puedan crecer en períodos cortos de tiempo, ocasionando daños de cosecha similares a los que ocurren cuando no se realizan labores para eliminar las malezas (Carrero, 1996)

En la actualidad una de las alternativas es el uso de productos de origen biológico existiendo una enorme diversidad de agentes de control, entre ellos están los micoherbicidas que son hongos enemigos naturales o extraños de las plagas, malas hierbas o de agentes causantes de enfermedades de las plantas cultivadas o silvestres (Monte, 1994).

Por estas razones, se investigó el potencial de cepas fungales nativas, de suelos de ecosistemas del sur del país, como un potencial biocontrolador. Las cepas fungales que presentaron mejor actividad biológica podrán ser ensayadas en el control de la inhibición de la germinación de semillas de malezas.

En el Ecuador, se han realizado estudios recientes sobre control biológico con hongos imperfectos del género *Trichoderma*, como hiperperásitos y como herbicidas, en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, financiados por instituciones como CONACYT y CABI-Bioscience (ESPOCH, 2004). Además el laboratorio de microbiología de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, presentó un proyecto al FUNDACYT en conjunto con el CELA, para la formación de un banco de cepas de microorganismos benéficos para la agricultura, los mismos que serán utilizados como biofertilizantes, biocontroladores, promotores de crecimiento vegetal y aceleradores de la descomposición de la materia orgánica (PUCE, 2006) y en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Azuay existe el estudio de la actividad biocontroladora de hongos de suelo ante organismos fitopatógenos (Mosquera, P. Duran, M. 2005).

El propósito de este trabajo fué identificar cepas fungales con potencial herbicida sobre semillas de malezas, como base para futuros estudios y síntesis de nuevos controladores químicos no perjudiciales para el ambiente.

CAPÍTULO 1

MARCO TEORICO

1.1 Las malezas

La palabra maleza se deriva del latín "malitia" que se traduce como "maldad" diferentes autores la definen como "planta que crece donde no es deseada o planta fuera de lugar" Klingman (1966), Rincón *et al.* (1968) define a la maleza en forma general como "plantas nocivas, molestas, desagradables a la vista y a la vez inútiles"; igualmente, en el sentido agronómico como "aquellas plantas que compiten con los cultivos y reducen tanto los rendimientos como la calidad de la cosecha, obstaculizando además la recolección de la misma.

La Weed Society of America resume los diferentes conceptos de maleza a "todo vegetal que se encuentra en un cultivo impidiendo o perjudicando su desarrollo; que se desarrolla en una localización no deseada, sin utilidad práctica e indeseable para los cultivos en los que se establece (*aunque algunas pueden formar parte de los pastizales o ser medicinales o energéticas, pero cuando ofrecen estas características dejan de considerarse como males hiervas*) de crecimiento espontáneo y perjudicial para el hombre, animales y cosechas (WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 1983).

Las malezas son plantas indeseables que crecen como organismos macroscópicos junto con las plantas cultivadas, a las cuales les interfieren su normal desarrollo. Son una de las principales causas de la disminución de rendimientos en cultivos, debido a que compiten por agua, luz solar, nutrimentos y dióxido de carbono; segregan sustancias alelopáticas; son albergue de plagas y patógenos, dificultando su combate y finalmente, obstaculizan la cosecha, bien sea ésta manual o mecanizada. (Rodríguez, 2000).

1.2 Competencias e interacciones de las malezas con las plantas cultivadas

Las malezas compiten con las plantas cultivadas por el espacio útil, la luz, el agua y los elementos nutritivos que hacen que las plantas cultivadas disminuyan su

rendimiento y por consecuencia tengan un desarrollo menor a una planta sana sin competencia por recursos. (Rodosevich, 1987; Fernández y García et al., 1989)

1.2.1 Competencia por el espacio útil

La competencia por el espacio afecta tanto a las partes aéreas como a las subterráneas. Esta comprobada que el desarrollo radicular de una planta disminuye cuando crece en vecindad de otras. La competencia por el espacio aéreo depende del nivel de infestación y de la velocidad de crecimiento. Se trata de un efecto masa en el que factores ambientales y de suelo, unidos a la biología y fisiología de las malas hierbas, juegan un papel decisivo. (Urbano, 1999).

1.2.2 Competencia por la luz

La competencia por la luz dependerá según la época del año (en países con estaciones) y el modo de propagación. Las malezas que se reproducen habitualmente por semillas suelen resultar menos dañinas por su competencia por la luz que las que se reproducen vegetativamente debido a que las sustancias que se almacenan en raíces, rizomas, estolones, bulbillos, permiten una brotación y un crecimiento rápido que pueden ahogar a las plantas pequeñas del cultivadas aun muy jóvenes. (Urbano, 1999).

1.2.3 Competencia por el agua

La competencia por el agua del suelo depende del nivel de invasión de las malas hierbas y de la actividad transpiratoria. Teniendo en cuenta el papel de la luz en la apertura de los estomas y en el consumo de agua por la transpiración, las siembras ralas desplazan esta competencia a favor de las malezas adventicias; por el contrario, altas densidades de siembra pueden desplazar el nivel de competencia a favor del cultivo. (Urbano, 1999).

1.2.4 Competencia por elementos nutritivos

La competencia por los elementos nutritivos es, quizás, el factor que mas influencia ejerce en el rendimiento del cultivo. Las malezas extraen cantidades importantes de nutrientes que en otro caso, estarían disponibles para las plantas cultivadas. (Urbano, 1999).

Los elementos nutritivos que extraen las malezas dependen de la especie invasora y con el grado de infestación. Algunas especies del género *Cirsium* spp. ó *Convolvulus* spp. son exigentes en nitrógeno y potasio, pudiendo superar, en casos de fuertes invasiones, las extracciones de los cultivos.

1.2.5 Interrelaciones entre malezas y plantas cultivadas.

A parte de los fenómenos de competencia, se producen otras relaciones cuya manifestación es menos clara que, con frecuencia, producen efectos depresivos muy marcados sobre el desarrollo de los cultivos. Las interacciones mas notable corresponden a entrecruzamientos y anastomosis radiculares, excreción de sustancias de desecho (efectos alelopáticos) y acumulación de raicillas muertas o restos de hojas y tallos (Beltrán, 1997)

Se ha detectado en las excreciones radiculares de algunas gramíneas u dicotiledóneas adventicias, la presencia de sustancias con efectos inhibidores o tóxicos para los cultivos. Por ejemplo la preparación de extractos a partir de estolones de *Agropyron repens* L. a concentración adecuada, puede inhibir la germinación de semillas de avena. Raíces muertas de *Bromus* spp. pueden inhibir el crecimiento de algunas gramíneas. El alcaloide absintina, obtenido de *Artemisia absinthium* L., impide el desarrollo de cereales, entre otras. (Urbano, 2002)

1.3 Relación con plagas y enfermedades

Las malezas sirven de refugio a insectos patógenos y nemátodos fitopatógenos que pasan parte de su ciclo biológico dentro o fuera de los campos cultivados, facilitando la invasión del cultivo y generando daños directos o indirectos considerables.

De la misma manera, las malezas pueden facilitar la transmisión de enfermedades criptogámicas, virosis o fúngicas. Se ha detectado la presencia de virus que pueden ser, a partir de ellas, transferidos por pulgones, ácaros, nemátodos, etc., a las plantas de cultivo. (Urbano, 2002)

1.4 Características biológicas de las malezas

1.4.1 Fácil de dispersión

Las semillas de las malezas se dispersan muy fácilmente aprovechando que muchas de ellas tienen unas estructuras o formas que les permite ser transportadas por el aire, el agua o adherirse en los pelos de los animales. Muchas de las semillas no son digeridas por aves o mamíferos y, en consecuencia, permanecen viables en sus excrementos. (Urbano, 2002)

1.4.2 Elevada capacidad de persistencia

Las razones que permiten perpetuarse a las malezas son la elevada producción de semillas o propágulos, especialmente si las condiciones ecológicas son favorables; largo período de viabilidad, que hacen que la gran mayoría de sus semillas permanezcan en el suelo con una elevada capacidad de germinación y, por tanto viable por muchos años; germinación escalonada, que facilita su resistencia a la acción herbicida o selecciona las poblaciones que se escapan de la época idóneas de aplicación de esos pesticidas, adaptabilidad fisiológica, que se pone de manifiesto por la gran rusticidad de las malezas frente a las plantas cultivadas, permitiéndolas desarrollarse en condiciones adversas y siendo capaces de completar rápidamente son la consiguiente producción de semillas; y riqueza genética, que las proporciona una plasticidad genotípica grande para adaptarse a cambios de ambientes. Además, esta variabilidad genética y su potencial de recombinación les permite desarrollar genotipos resistentes a algunos herbicidas (Urbano, 2002).

1.4.3 Alta capacidad de competencia

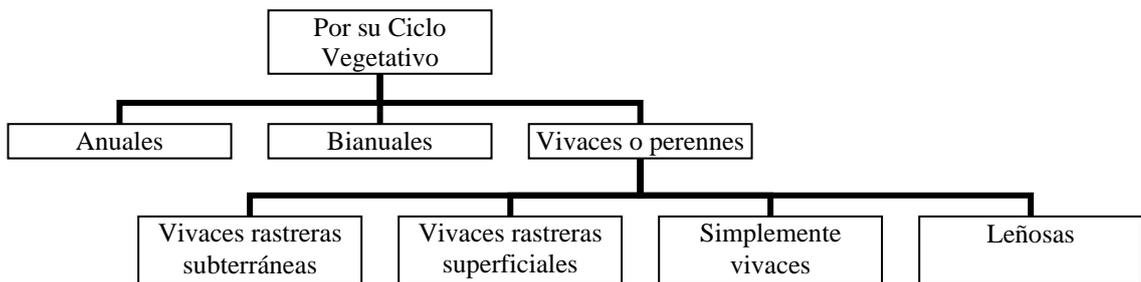
Esta es una característica esencial de toda maleza ya que tiene que competir, frente a los cultivos, por los recursos del medio (agua, nutrientes, luz, etc.) A lo largo de la evolución estas especies han desarrollado una serie de características que les permite dominar al cultivo, vivir a sus expensas e, incluso, sobrevivir más años que el cultivo, gracias a una elevada capacidad de proliferación, que produce un gran número de plantas viables dentro de un cultivo, elevado vigor, que se traduce en un desarrollado rápido y precoz, lo que unido a las características anteriormente citadas, son aún más perjudiciales para los cultivos. (Urbano, 2002)

1.5 Clasificación de las malezas

Dado el elevado numero de malezas que se pueden encontrar en los cultivos y con el objetivo de combatir las de forma mas adecuada, suelen clasificarse atendiendo a los siguientes criterios:

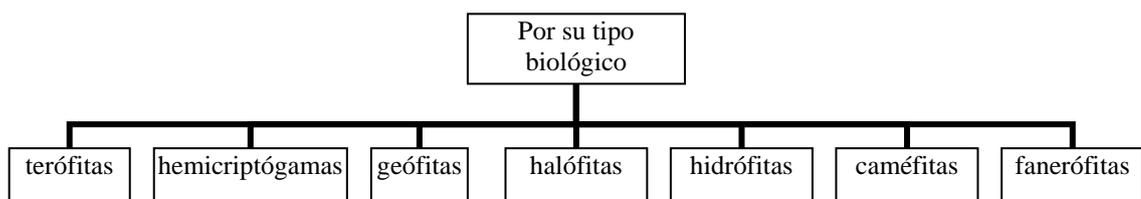
1.5.1 Ciclo Vegetativo

Se pueden desarrollar en verano o invierno y completar su ciclo biológico en menos de un año, y se clasifican en:



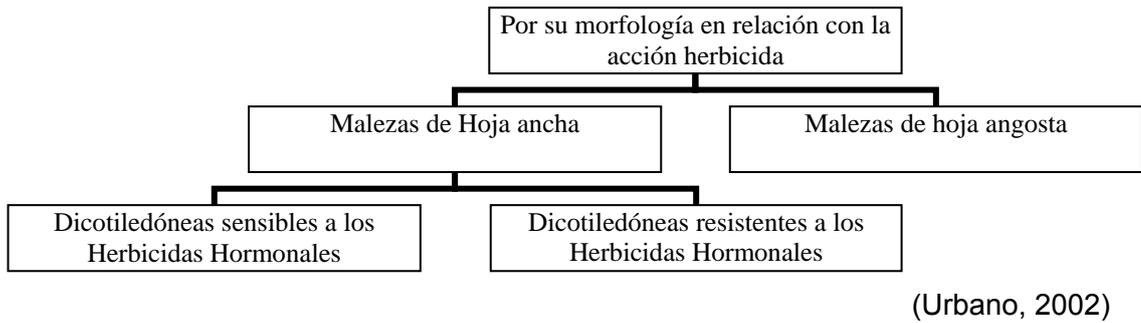
1.5.2 Ciclo Biológico

La clasificación de las malezas desde el punto de vista biológico, tiene gran interés para conocer sus ciclos y formas de desarrollo, y se clasifican en:



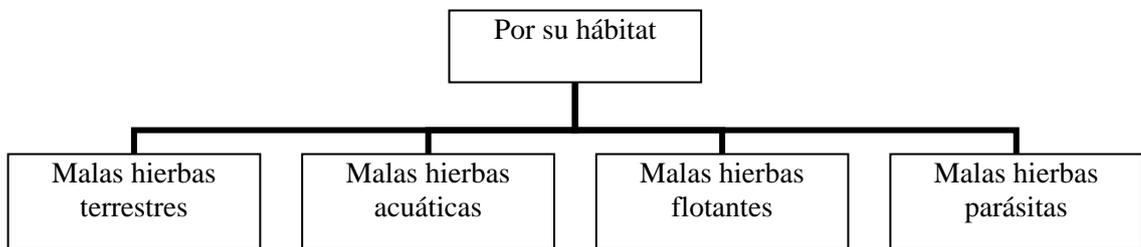
1.5.3 Morfología en relación con la acción herbicida

La Morfología de las malezas según la utilización de herbicidas esta dividida en malezas de hoja ancha (dicotiledóneas) que suelen ser más sensibles a la acción herbicida y malezas de hoja angosta (monocotiledóneas)



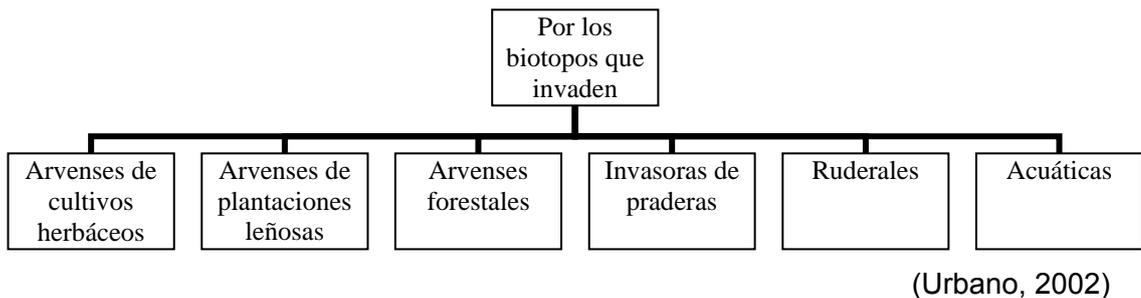
1.5.4 Hábitat

Esta clasificación esta dada por el hábitat que ocupan sean estas terrestres, en zonas encharcadas o inundadas, sobre el agua o germinan sobre otros vegetales.



1.5.5 Biotopos que invaden

Esta clasificación hace referencia a las zonas o cultivos determinados en donde se desarrollan perfectamente.



1.6 Métodos de control de las malezas

El combate de las malezas se originó cuando el hombre abandonó la recolección y la caza, haciéndose sedentario y por ello, desde el inicio de la agricultura, el hombre ha dedicado grandes esfuerzos para combatirlas: primero en forma manual, posteriormente con el empleo de algunos artefactos, herramientas y equipos para mejorar la eficiencia en su control. En nuestros días la utilización de sustancias

químicas o biológicas que se aplican, sobre el suelo o a las malezas y sirven para prevenir o retardar su crecimiento o germinación.

Algunos de los métodos utilizados para contrarrestar a las malezas son el preventivo, culturales, método físico, mediante el fuego; el manual con uso de herramientas menores; el mecánico con empleo de implementos agrícolas y el método químico, mediante la aplicación de herbicidas, siendo éste el método que ha revolucionado la técnica agrícola en nuestro tiempos. (Rodríguez, 2000).

1.6.1 Control químico

El control químico de malezas ha permitido liberar al hombre del enorme esfuerzo que significa limitar la interferencia ejercida por la maleza sobre el cultivo, siendo este método más eficiente y eficaz en muchos casos; además, los herbicidas pre emergentes constituyen un seguro contra las futuras condiciones ambientales adversas, como las lluvias continuas que impedirían el empleo de mano de obra y de maquinarias en labores de desmalezamiento.

En el mundo, el control químico de malezas realmente se inicia en la década de 1940, a pesar de existir referencias anteriores sobre la translocación de sustancias reguladoras de crecimiento. Klingman (1966) cita a Sachs (1887) y refiere que entre 1897 y 1900, Bonnet en Francia, Shultz en Alemania y Bolley en los Estados Unidos, trabajando independientemente, usaron soluciones desales de cobre para el control de malezas de hoja ancha en cereales. Así mismo, refiere que en 1941, Pokorny en Estados Unidos logró la síntesis del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D); en 1942 Zimmerman y Hitchcock son los primeros en reportarlo como sustancia reguladora del crecimiento y que en 1944, March y Mitchell establecen su selectividad, y Hamner y Tukey lo usaron con éxito en el control de malezas en condiciones de campo.

Después del descubrimiento de la fitotoxicidad selectiva de los derivados químicos del grupo fenoxi, es cuando realmente ocurre el desarrollo del control químico; se inicia así la tecnología moderna con nuevos productos, unidos con nuevas prácticas y técnicas de utilización, que permitieron su extensión en el mundo. Al mismo tiempo, se desarrolló la ciencia de la Malerbología, con especialistas en las diferentes áreas de esta nueva disciplina.

La definición original de herbicida hacía mención a productos químicos, pero con la utilización de los micoherbicidas para el control de malezas, los herbicidas han sido definidos por la Sociedad Americana de la Ciencia de Malezas (W.S.SA) como sustancias químicas y biológicas creadas para matar o retardar significativamente el crecimiento de las plantas. El factor más importante en el auge de los herbicidas es por la capacidad de muchos de ellos, llamados selectivos, de afectar o matar las plantas indeseables, sin dañarlas cultivadas. (Rodríguez, 2000).

1.7 Herbicidas

El término herbicida ha sido definido como sustancia química o biológica que mata o retarda significativamente el crecimiento de las plantas. La característica por la cual los herbicidas han sido aceptados, ha sido la de eliminar económicamente algunas especies de plantas, sin causarle daño irreversible a otras; esto es lo que se conoce como selectividad a un cultivo, pudiéndose controlar de esa forma a las especies que son malezas (Rodríguez, 2000).

Los herbicidas se clasifican según la época de aplicación en herbicidas de presembrado que se aplican antes de la siembra y requieren la incorporación en el suelo para ser distribuidos en una capa uniforme; zona en la cual germinan la mayoría de las semillas de malezas. Esta incorporación también evita la pérdida por volatilización y foto descomposición del producto. Herbicidas pre emergentes son aquellos que se aplican después de la siembra del cultivo pero antes de que germinen o brote el cultivo y las malezas. Actúan sobre las semillas de las malezas que están germinando, requiriendo de agua y lluvia después de su aplicación y son ventajosos por cuanto no requieren incorporación mecánica en el suelo. Herbicidas pos emergentes son los que se aplican después de la emergencia del cultivo y/o las malezas. Tienen la ventaja de ser útiles en la emergencia, pues no se aplican hasta que hayan emergido las malas hierbas, se pueden aplicar en cualquier tipo de suelo y no dependen de las condiciones de humedad de este, pero no se deben aplicar cuando las plantas se encuentran mojadas por el rocío o la lluvia (Venegas y Muñoz, 1982).

1.8 Detoxificación de los herbicidas y tolerancia

La base para la selectividad de los herbicidas es la capacidad que tienen las plantas de cultivo a tolerar o sobrevivir la aplicación de un herbicida, en una dosis

en la cual la maleza es afectada o muere. Esto puede ser debido a diferencia de absorción y translocación; velocidad y naturaleza con la cual es activado o detoxificado el herbicida, y las diferencias intrínsecas en sensibilidad en los sitios donde actúa el herbicida.

Para que un herbicida sea efectivo debe llegar al sitio donde la planta es más sensible a ese tóxico a la concentración correspondiente, causando daño severo y afectando su normal crecimiento y desarrollo. El metabolismo del herbicida resulta en detoxificación, un efectivo mecanismo para reducir la concentración del herbicida, incrementando de esa forma la tolerancia de la planta al químico. (Rodríguez, 2000).

1.9 Resistencia de las malezas a los herbicidas

La resistencia a los herbicidas es la capacidad que han desarrollado las poblaciones de malezas previamente susceptibles a un cierto herbicida para resistir a ese compuesto y completar su ciclo biológico cuando el herbicida es aplicado en sus dosis normales; esta capacidad se ha incrementado seriamente en los últimos años (Heap y LeBaron, 2002). Si bien la gran mayoría de los casos de resistencia a los herbicidas han ocurrido en los países desarrollados, también en los países en desarrollo varias malezas importantes han evolucionado a ciertas formas de resistencia con un considerable impacto económico negativo sobre algunos cultivos específicos.

1.10 Mecanismos de resistencia

Varios mecanismos confieren resistencia a los herbicidas. Los más comunes e importantes son aquellos relacionados con la insensibilidad del lugar-objetivo y del fortalecimiento del metabolismo del herbicida o la descomposición de los productos inactivos. Además, la resistencia puede ser atribuida al secuestro de los herbicidas (o su falta de acción debido a la separación física o temporal del herbicida de los tejidos sensibles o lugares-objetivo) o a una absorción reducida (Devine y Preston, 2000).

Existen casos en los que hay más de un mecanismo involucrado que confiere resistencia a los herbicidas en un individuo o en una población de plantas (resistencia múltiple). También es común que una maleza que ha desarrollado

resistencia a un herbicida específico exhiba también resistencia a otros herbicidas del mismo grupo de modo de acción porque comparten el mismo sitio de unión. Por lo tanto, una modificación de este sitio da lugar a una resistencia cruzada sobre el lugar-objetivo. Por ejemplo, en Costa Rica poblaciones de *Ixophorus unisetus* seleccionadas por su resistencia a imazapyr (un inhibidor de ALS) también tuvieron resistencia cruzada a un grupo de imidazolinone y herbicidas SFU (Chaves et al., 1994). Cuando la resistencia es promovida por otro mecanismo tal como el favorecimiento de la degradación del herbicida, puede ocurrir la resistencia cruzada a los herbicidas de modos de acción o procesos químicos no relacionados.

El conocimiento del modo de acción y del mecanismo de resistencia son importantes para diseñar e implementar la prevención de los herbicidas y las prácticas de manejo. El agrupamiento de los herbicidas de acuerdo a su modo de acción ha sido desarrollado como guía en el manejo de la resistencia. Los mejor conocidos son aquellos preparados por el Comité de Acción de Resistencia a los Herbicidas (Herbicide Resistance Action Committee - HRAC) y la Sociedad de Malezas de Estados Unidos de América (Weed Science Society of America - WSSA), (Retzinger y Mallory-Smith, 1997).

1.11 Prevención y manejo de la resistencia a los herbicidas

La aparición de casos de resistencia a los herbicidas es una indicación de un exceso de dependencia de los herbicidas dentro de un sistema particular de producción. Los países en desarrollo no están excluidos de la tendencia actual de esa dependencia de los herbicidas; estos compuestos son ampliamente usados en los sistemas de producción más avanzados así como también por los agricultores de escasos recursos. Sin duda, algunos de los casos más complejos de resistencia a los herbicidas en los países en desarrollo han ocurrido en zonas y en cultivos donde hay explotaciones comerciales y pequeños agricultores que han utilizado un solo herbicida o modo de acción como la principal herramienta para eliminar una maleza específica.

La mayor parte de las prácticas de manejo de la resistencia a los herbicidas hacen referencia a los sistemas de cultivos arables y se ha dado preferencia a ejemplos de los países en desarrollo para ilustrar su desarrollo e implementación. Hay sin embargo, casos de resistencia en plantaciones y pasturas que podrían justificar la

adaptación de prácticas específicas para enfrentar el problema de la resistencia a los herbicidas. (Powles y Shaner, 2001).

1.12 Manejo de poblaciones de malezas naturalmente resistentes a los herbicidas

La situación más común a la que se enfrentan los agricultores es controlar las malezas que han desarrollado resistencia a los herbicidas. Si bien la respuesta inmediata es cambiar a un herbicida diferente pero aún activo sobre esa población de malezas, el manejo a largo plazo de la resistencia puede solamente ser obtenido por medio de la integración de tácticas apropiadas basadas en el conocimiento de la biología y la ecología de las malezas, y el modo de acción del herbicida y los mecanismos de resistencia. Muy raramente existe información que cubra todos estos aspectos, especialmente en el caso de los sistemas de producción agrícola de los países en desarrollo. Sin embargo, comprendiendo las bases de la evolución de la resistencia a los herbicidas, aprovechando las experiencias recogidas en otros lugares con casos similares y volviendo a buenas prácticas de manejo de la tierra, es posible diseñar e implementar programas adecuados de manejo.

Varias tácticas agronómicas pueden contribuir a limitar la difusión local, el aumento de la densidad y el impacto de las poblaciones resistentes. Es necesario enfatizar que las prácticas de manejo deberían estar dirigidas a disminuir la proporción de semillas de individuos resistentes en el banco de semillas del suelo, especialmente de aquellas especies cuyas semillas tienen una limitada longevidad y persistencia en el suelo. Estas prácticas que previenen la formación de semillas y su dispersión por las plantas que han sobrevivido a todas las prácticas de control durante el ciclo de cultivo deberían contribuir a la declinación de las infestaciones con individuos resistentes. Por ejemplo, en Australia, algunos agricultores usan piezas especiales o modifican sus cosechadoras para retener las semillas de *Lolium rigidum*, una práctica que ha demostrado ser valiosa para manejar las poblaciones que presentan resistencia múltiple (Powles, 1997) La quema de los residuos de las cosechas o su incorporación al suelo también pueden destruir las semillas de las malezas o prevenir la producción de las plantas que están madurando en el momento de la cosecha del cultivo. (Valverde, 1994)

1.13 Alternativas al uso de herbicidas para el control de malezas

Las plantas tienen sus propios mecanismos de defensa y son los “aleloquímicos” de hecho, son los herbicidas naturales. La alelopatía ha sido definida por la “Internacional Allelopathy Society” como la ciencia que estudia los procesos que implican la acción de los metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos que influyen en el crecimiento y desenvolvimiento de los sistemas agrícolas y biológicos, siendo efectos positivos o negativos. Los productos aleloquímicos aislados de plantas o microorganismos tienen implicaciones ecológicas por ser biocomunicadores dentro de la naturaleza (Macías, 1999) siendo estos, una importante fuente de nuevos tipos de modelos estructurales de herbicidas. Estos herbicidas naturales podrían ser más específicos con nuevos modelos de acción y menos perjudiciales que los que son usados actualmente en la agricultura (Macías, 1999) La alelopatía nos puede proveer de nuevos conceptos para incorporar al control y manejo de las malezas, variedades de cosechas, y nuevas generaciones de fitotoxinas naturales como herbicidas. Algunas nuevas técnicas implican la alelopatía sugeridas para el control de las malezas y una de ellas es el uso natural o modificaciones alelopáticas como herbicidas. (Macías, 1999).

1.14 Metabolitos Bioactivos de Hongos de Suelo

Hongos fitopatógenos han sido químicamente estudiados a fin de establecer los metabolitos secundarios que generan y evalúan la actividad biológica que estos presentan, tanto sobre el hospedero como sobre otros blancos biológicos. Se han descrito especies de *Botrytis* como productoras de metabolitos secundarios de marcada actividad biológica tales como botridial aislado desde *Botrytis cinerea*, este metabolito presenta efecto antibiótico sobre *Bacillus subtilis* y *Pythium debaryanum*, y también actividad citotóxica frente a importantes líneas celulares (Collado et al., 2000) El género *Aspergillus* ha sido caracterizado por ser fuentes de compuestos como β , γ , dehidrocurvalina, α, β - dehidrocurvalarina, 8- β -hidroxi-7-oxocurvalarina y 7-oxocurvalarina con actividad nematocida sobre *Pratylenchus penetrans* causante de lesiones radiculares en vegetales (Kusano et al., 2003)

Experiencias similares se han desarrollado con especies como *Alternaria alternata* productora de fitotoxinas, *Fusarium oxysporum* productora de oxisporidinona responsable de actividad antifúngica sobre hongos fitopatógenos, todos estos antecedentes y otros reportados en literatura nos dejan ver claramente el potencial

de los hongos fitopatógenos como excelentes productores de metabolitos secundarios con las mas diversas actividades sobre diferentes blancos, con posibles aplicaciones agronómicas.

Aunque se desconozcan las funciones naturales de los metabolitos secundarios, se asume que están relacionados con mecanismos de defensa y comunicación. La producción de metabolitos secundarios normalmente empieza en la fase de crecimiento estacionario del hongo y esta regulada por un mecanismo desconocido hasta ahora. Factores ambientales y nutricionales influyen en su regulación, pero no son factores específicos para la producción de los metabolitos secundarios (Cutler y Cutler, 1999). Entre los principales metabolitos secundarios tenemos: antibióticos, ciclosporinas, ácidos mevánicos, alcaloides, compuestos antifúngicos, etc, los mismos que han sido aislados de hongos de suelo; géneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Fusarium* tienen la capacidad de sintetizar diversas estructuras químicas (Osterhage, 2001; Guitiérrez et al., 2000).

1.15 Los Micoherbicidas

Una opción al uso de herbicidas químicos son todos aquellos productos de desarrollo biológico, siendo una alternativa los herbicidas fungales, de los cuales se han obtenido preparados comerciales entomopatógenos como por ejemplo *Vertalec* proveniente del hongo *Verticillium lecanii* que se lo utiliza contra pulgones, en cultivos bajo invernadero, e incluso productos con acción herbicida (micoherbicidas) como *Colletotrichum gloeosporioides* utilizado contra *Aeschynomene virginica* que ataca a los cultivos de arroz y soja; pero de uso restringido debido a la dificultad de encontrar formulaciones adecuadas para asegurar su eficacia (Carrero, 1996)

El reino fungi se caracteriza por una elevada diversidad. Actualmente son conocidas alrededor de 70000 especies de un total estimado de 1.5 millones de hongos (Turner, 2000). En su mayoría se trata de hongos filamentosos y uno de sus hábitats preferidos es el suelo. El efecto antagonista desarrollado por hongos de suelo contra patógenos vegetales demuestra que este nicho ecológico es una importante fuente de cepas biocontroladoras. En efecto, hongos del género *Trichoderma* son comercializados como biopesticidas específicos contra *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Fusarium*, incrementando el crecimiento de raíces y la captación de nitrógeno hasta en un 25% (Ligon, 2000). La búsqueda de cepas

nativas procedentes de ecosistemas de cultivo o no antropizados puede generar nuevos biocontroladores como alternativa al uso de herbicidas químicos.

Ecuador presenta nichos ecológicos diversos donde el aislamiento y caracterización de hongos de suelo puede guiarnos al desarrollo de herbicidas originarios de ecosistemas nativos, de tal forma, la introducción de estas alternativas contra los métodos tradicionales, de control de malezas, permitirá tener ensayos que evalúen la actividad herbicida de metabolitos secundarios aislados a partir de hongos de suelo.

CAPITULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Solventes, reactivos químicos y suplementos para medios de cultivo

La extracción de los extractos de los cultivos sólidos se lo realizó mediante acetato de etilo (solvente) grado técnico destilado y metanol de grado técnico.

Para la formulación de los medios de cultivos de hongos se utilizó:

- Agar (grado técnico, fabricación nacional)
- Benzetacil Penicilina G benzatínica, polvo para suspensión 1 2000 000 UI)
- Extracto de levadura (Merk, Darmstadt, Alemania).
- Glucosa (grado técnico, fabricación nacional)
- Nistatina (suspensión, Laboratorio Químico Farmacéutico, Guayaquil, Ecuador) 1000.000 U/ml
- Puré de papa deshidratado, arroz (adquiridos en supermercados)
- Sales inorgánicas (NaNO_3 , KCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4).

2.1.2 Medios de Cultivo: Composición

Los medios de cultivo descritos fueron disueltos en agua destilada y autoclavados a 121 grados centígrados y a 1.1 Bar por 15 minutos a un pH de 5.5. Los medios sólidos para hongos fueron preparados con la adición de agar al 1.5%. Se describe las formulaciones en eso para la preparación de un litro de medio.

Medio PDA: Papa. Dextrosa, Agar: papa 20 g, glucosa 20 g, agar 15g, pH 5.5

Medio Czapeck: NaNO_3 2g, KCl 05g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, KH_2PO_4 1g, extracto de levadura 5g, pH 5.5.

2.1.3 Semillas para ensayos de fitotoxicidad

Para las pruebas de fitotoxicidad se emplearon semillas de especies cultivables como *Lactuca sativa* L. (lechuga / dicotiledónea), *Triticum aestivum* L. (trigo / monocotiledónea) y *Rumex crispus* L. (Maleza / Polygonaceae) como maleza de cultivos agrícolas. *Lactuca sativa* se encuentran citada como organismo de prueba en ensayos que evalúan fitotoxicidad de productos naturales (Macías *et al.*, 2000).

2.2 Métodos

2.2.1 Zonas de Muestreo

Las muestras de suelo requeridas para aislar cepas fungales se recolectaron en dos localidades de diferente formación ecológica con el objetivo de obtener muestras de suelos cultivados y no antropizados del sur del país. Los sitios de muestreo incluyen: Bosque Siempre Verde Montano Alto 3100 m s.n.m. (Bosque Protector Mazán) (Sierra, 1999) y Zona de Cultivo 2900 m s.n.m. (Cultivos de los alrededores de la ciudad de Cañar).

Las muestras recolectadas en Mazan corresponden a suelos de bosques secundarios, mientras que las muestras de la provincia de Cañar corresponden a diferentes suelos de cultivos.

2.2.2 Recolección de las muestras de suelo

Las muestras de suelo se tomaron completamente al azar en una profundidad no mayor a los 20 cm de profundidad (Horizonte A), recolectando cinco muestras de aproximadamente 5 gramos y colocadas en fundas de polietileno para ser transportadas al laboratorio de la Universidad del Azuay a una temperatura de 4 grados centígrados. El tiempo de almacenamiento no fue mayor a 24 horas para evitar la pérdida de viabilidad de los microorganismos (Cazar, 2006)

2.2.3 Aislamiento de hongos de suelo

Se prepararon diluciones seriadas a partir de una solución madre 1:10 (1 g de muestra de suelo más 9 ml de agua destilada estéril) en forma seriada hasta llegar a una dilución de 1×10^{-6} para cada muestra de suelo (Christensen, 2005)

Se inoculó 1 ml de las diluciones en el rango 1×10^{-3} - 1×10^{-6} en placas petri con medio sólido para el crecimiento de hongos (PDA). La temperatura de incubación será de 25°C, y el tiempo dependerá del crecimiento del micelio, no siendo superior a dos semanas. Las colonias de hongos obtenidas se repicarán a placas de PDA (composición g/L: puré de papa deshidratado 20, glucosa 20 y agar 15, pH 5,5) (Figura 4 y 5) e YMG (composición g/L: extracto de levadura 4, extracto de malta 10, glucosa 10 y agar 15, pH 5,5) con adición de antibióticos hasta lograr obtener aislados puros (Stadler *et al.*, 1994).

2.2.4 Cultivo sólido de aislados fungales y obtención de extractos

Los hongos de suelo obtenidos a partir de las muestras colectadas fueron cultivados en medio sólido. Las fermentaciones en estado sólido se realizó en sustrato de arroz suplementado con medio Czapek (Figura 7) sin sacarosa (NaNO_3 2 g, KCl 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4 1 g, Extracto de Levadura 5 g). Aproximadamente 50 g de sustrato se colocó en erlenmeyers y autoclavados por 15 minutos. Una solución de esporas del hongo a cultivar (1×10^4 esporas/ml) es esparcida asépticamente en la superficie de los cultivos. Se procederá a la extracción con solvente orgánico (Acetato de Etilo) cuando se verifique la completa colonización del micelio en la superficie del cultivo. El extracto fue concentrado a presión reducida con la ayuda de un rotavapor (Smits, *et al.*, 1996). Una vez obtenidos los extractos estos son diluidos en metanol a una concentración de 500 ug/ml y 1000 ug/ml.

2.2.5 Pruebas de germinación

Las pruebas de germinación permiten determinar las semillas que presentan un porcentaje de germinación alto que permita desarrollar los bio ensayos y eliminar errores que afecten los resultados esperados. Las pruebas de germinación se las realizo en cajas petri, abiertas y cerradas, en diferentes condiciones de sustrato, luz y temperatura, obteniendo mejor rendimiento aquellas que fueron sometidas a periodos de 12 horas de luz y 12 de oscuridad a una temperatura promedio de 22 grados centígrados y sustrato papel filtro (Anexo 1).

2.2.6 Fitotoxicidad

Se determinó la capacidad de los extractos para inhibir la germinación de semillas de maleza de hoja ancha *Rumex crispus* L. (maleza / dicotiledónea) y dos cultivos *Lactuca sativa* L. (lechuga / dicotiledónea) y *Triticum aestivum* L. (trigo / monocotiledónea) evaluando la actividad pre emergente y pos emergente.

Se registró la germinación de las semillas de estas tres especies frente a 20 µl de los extractos impregnados en discos de papel Wattman 4 con un diámetro de 15 mm de diámetro. Los discos se colocaron en el fondo de viales de 5 cm de longitud y diámetro colocando 10 semillas de lechuga, 10 semillas de maleza y 4 semillas de trigo colocadas en cada vial, por triplicado, se añadió 100 µl de agua destilada y se introdujeron los viales así preparados, más un control (preparado con un disco sin extracto) en una cámara de humedad, acondicionada con 3ml de agua destilada y selladas con papel film para evitar la evaporación, este proceso se aplicó para extractos a concentraciones de 1000 y 500 µg/ml. Las cámaras se mantuvieron a 23 °C y 12 horas de luz y 12 de oscuridad por un lapso de 5 días para las semillas de lechuga y trigo y 15 días para la maleza (Anexo 2). Se evaluó la germinación de las semillas comparadas con los controles y reportadas el número de semillas germinadas. (Abate, 1989).

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA y Chi cuadrado.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS y DISCUSIONES

3.1 Resultados

3.1.1 Obtención de muestras y aislados fungales

Los aislados fungales se obtuvieron a partir de la recolección de suelos de cultivo de la provincia del Cañar y un bosque natural de la provincia del Azuay (Cuadro 3.1) Según la metodología aplicada, se obtuvieron 35 aislados fungales designándoles un código el cual identifica el lugar de la muestra, dilución y morfología de cada hongo aislado.

Cuadro 3.1 Localidades de recolección de muestras de suelo para la obtención de aislados fungales.

Provincia	Localidad	Longitud E	Latitud N	Altura m s.n.m.	Vegetación Asociada
Cañar	Nar	729802	9720229	2919	Cultivo maíz con frejol
Cañar	Entrada a Nar	729737	9720223	2916	Suelo Arado
Cañar	Frente entrada Nar	73030	9719963	2963	Cultivo Alverja
Cañar	Frente entrada Nar	730210	9719980	2951	Cultivo papa
Cañar	Chorocopte	728690	9715218	3353	Cultivo Oca
Cañar	Chorocopte	728736	9715283	3346	Pastizal
Cañar	Chorocopte	728806	9715379	3339	Cultivo Papa
Azuay	B. P. Mazán	708466	9682393	3127	Bosque Secundario / Melastomataceae, Bromelias
Azuay	B. P. Mazán	708182	9682323	3136	Bosque Primario / Melastomataceae, Helechos, materia orgánica
Azuay	B. P. Mazán	708184	9682327	3136	Bosque Primario / Bajo cueva de un árbol
Azuay	B. P. Mazán	708181	9682326	3136	Bosque Primario / Hueco bajo un árbol
Azuay	B. P. Mazán	708728	9682452	3146	Bosque Secundario / Melastomataceae, Bromelia, Piperaceae
Azuay	B. P. Mazán	708728	9682451	3143	Bosque Primario / Árboles de 30 m con orquídeas y bromelias

3.1.2 Rendimiento de los metabolitos secundarios

En el proceso de investigación y metodología de trabajo se trabajó con 16 de los 35 aislados fungales obtenidos, extrayendo de cada uno sus metabolitos secundarios, de los cuales se utilizó los extractos de los hongos H1, H4, H8, H13 y H16 (Anexo 3) por presentar mayores rendimientos en relación a los demás extractos aislados. El cuadro 3.2 muestra el rendimiento de cada uno de los extractos crudos obtenidos en la fermentación sólida del micelio del hongo.

Cuadro 3.2. Rendimiento en gramos de los extractos crudos a partir de fermentación sólida

Código	Extracto (gr)
H1	0,4031
H4	0,5583
H8	0,403
H13	0,5409
H16	1,3959

3.1.3 Porcentaje de germinación

Las semillas de *Lactuca sativa* L. y *Triticum aestivum* L. presentaron un 100% de germinación, mientras que las semillas de *Rumex crispus* L alcanzaron un porcentaje de 56 % de germinación. Las pruebas de germinación de semillas de malezas se realizó con diferentes especies, seleccionándose *Rumex crispus* L. por presentar un porcentaje superior al 50 por ciento.

3.1.4 Pruebas de fitotoxicidad

Las pruebas de fitotoxicidad se la realizaron mediante la comparación del control vs los distintos tratamientos (extractos) a una concentración de 500 gr/ml] y [1000 gr/ ml] según los datos obtenidos se aplico un ANOVA o un Chi-cuadrado (dependiendo de la normalidad de los datos). Cuando se establecieron las diferencias significativas se realizó un análisis de comparaciones múltiples (post hoc) que nos permitió controlar la tasa de error al efectuar varios contrastes utilizando las mismas medias, y determinar entre cual o cuales extractos existieron diferencias en relación con el control, el análisis aplicado es un DMS (diferencias mínimas significativas) LSD (Least significant difference).

3.1.5 Fitotoxicidad en semillas de *Lactuca sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Rumex crispus* L.

PRUEBAS DE PRE EMERGENCIA

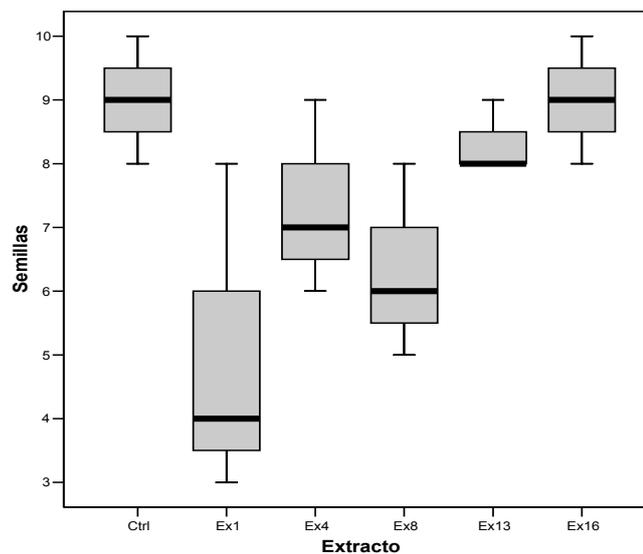
Extractos a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Lactuca sativa* L.

El bio ensayo a una concentración de 500 ug/ml indica que no existe diferencias significativas en la inhibición de la germinación de las semillas evaluadas con un valor $p= 0.319$ (Anexo 4).

Extractos a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Lactuca sativa* L.

El bio ensayo a una concentración de 1000 ug/ml indica la existencia de diferencias significativas en la inhibición de la germinación de semillas evaluadas ($p= 0.042$). Con el análisis de DMS observamos que únicamente el extracto H1 inhibe la germinación en comparación con el control con un valor $p= 0.008$ (Anexo 5). En el gráfico 3.1 se aprecia las medianas de cada uno de los grupos comparados y su rango. El extracto H1 tiene una mediana significativamente menor al control; mientras que los demás extractos evaluados no presentan diferencias significativas con la mediana del control de crecimiento.

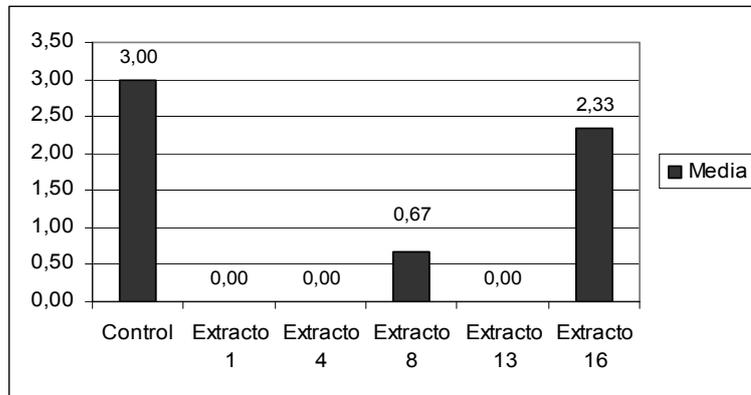
Gráfico 3.1 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. para extractos a una concentración de [1000 ug/ml]



Extractos a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Triticum aestivum* L.

El bio ensayo a una concentración de 500 ug/ml presenta Chi-2 de 41.333 que en relación al valor tabulado de 11.070 indica que los extractos inhiben la germinación de las semillas en comparación con el control (Anexo 6). El gráfico 3.2 hace una comparación de las medias de los grupos comparados, indicando que las semillas tratadas con los extractos H1, H4, H13 inhiben la germinación y el extracto H8 tiene una media significativamente menor al control y el extracto H16 no presenta diferencias significativas en relación al control de crecimiento.

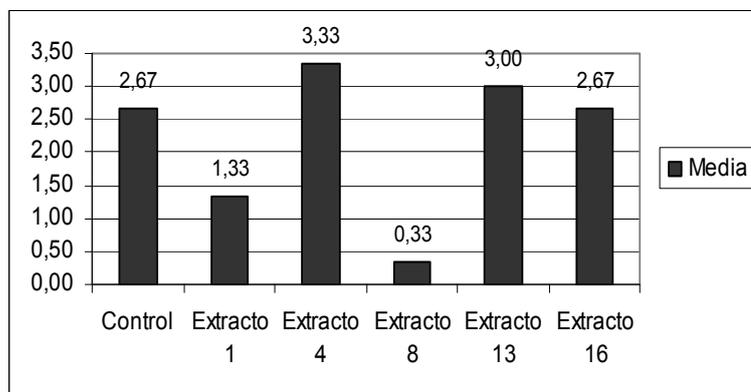
Gráfico 3.2 Comparación de la media aritmética de la actividad inhibitoria de los extractos en semillas de *Lactuca sativa* L. a una concentración de [500 ug/ml]



Extractos a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Triticum aestivum* L.

El bio ensayo a una concentración de 1000 ug/ml presenta Chi-2 de 20.5714 que en relación al valor tabulado de 11.070 indica que los extractos inhiben la germinación de las semillas en comparación con el control (Anexo 7). El gráfico 3.3 hace una comparación de las medias de los grupos comparados, indicando que las semillas tratadas con los extractos H1 y H8 tienen una media significativamente menor al control y los extractos H4 H13 H16 presentan una media igual o superior en comparación con el control de crecimiento.

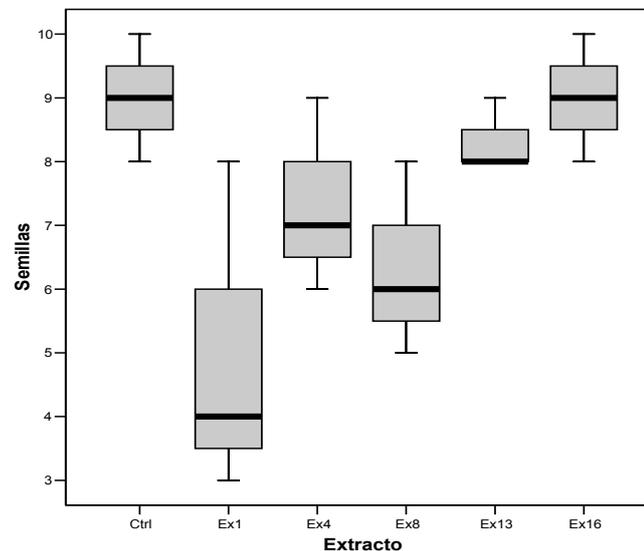
Gráfico 3.3 Comparación de la media aritmética de la actividad inhibitoria de los extractos en semillas de *Triticum aestivum* L. a una concentración de [1000 ug/ml]



Extractos a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Rumex crispus* L.

El bio ensayo a una concentración de 500 ug/ml indica la existencia de diferencias significativas en la inhibición de la germinación de las semillas evaluadas ($p = 0.042$). Con el análisis del DMS observamos que únicamente el extracto H1 presenta una inhibición de la germinación en comparación con el control con un valor $p = 0.08$ (Anexo 8). En el gráfico 3.4 se pueden apreciar las medianas de cada uno de los grupos de datos comparados. El extracto H1 tiene una mediana significativamente menor al control positivo; mientras que los demás extractos evaluados no presentan diferencias significativas con la mediana del control de crecimiento.

Gráfico 3.4 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de *Rumex crispus* L. para extractos a una concentración de [500 ug/ml]



Extractos a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Rumex crispus* L.

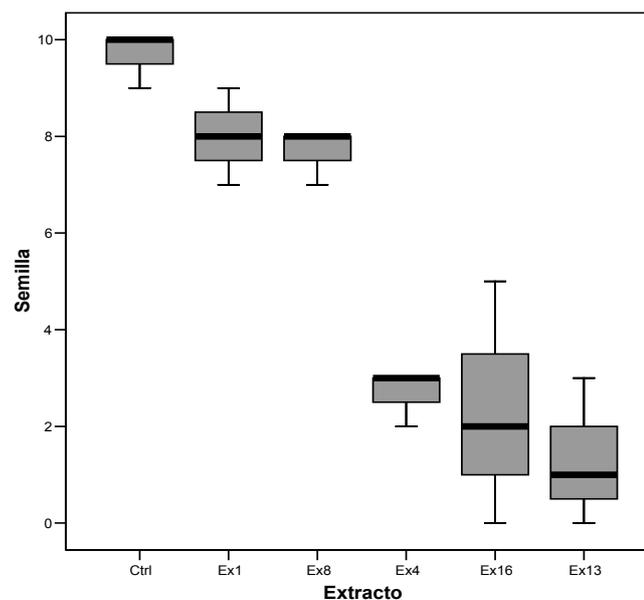
El bio ensayo a una concentración de 500 ug/ml presenta Chi-2 de 10.5681 que en relación al valor tabulado de 11.070 indica que los extractos no inhiben la germinación de las semillas en comparación con el control. (Anexo 9).

Pruebas de pos emergencia

Extractos a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Lactuca sativa* L.

El bio ensayo a una concentración de 500 ug/ml indica la existencia de diferencias significativas en la inhibición de la germinación de las semillas evaluadas ($p=0.000$). Con el análisis DMS observamos que los extractos H4, H13, H16 presentan una inhibición de la germinación en comparación con el control ($p=$ de 0.00) para H4, H13, H16 (Anexo10). En el gráfico 3.5 que se presenta se puede apreciar las medias de cada uno de los grupos de datos comparados y su rango. Los extractos H4, H13 y H16 tienen una mediana significativamente menor al control positivo, mientras que los extractos H1 y H8 no presentan diferencias significativas con respecto a la mediana del control de crecimiento.

Gráfico 3.5 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. para extractos a una concentración de [500 ug/ml]

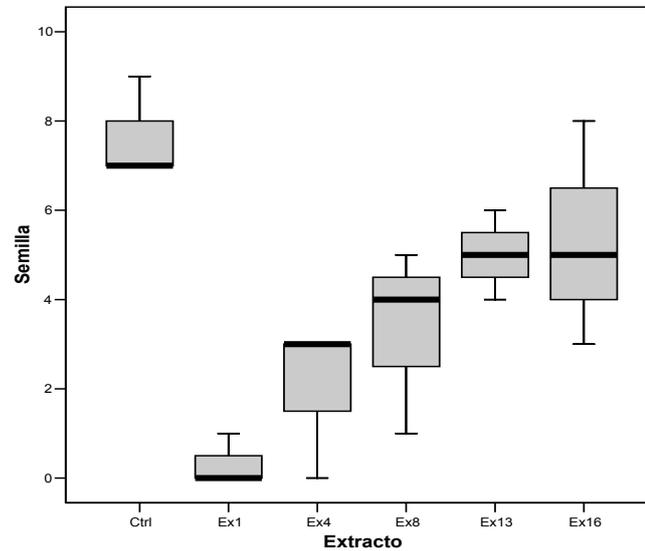


Extractos a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Lactuca sativa* L.

El bio ensayo a una concentración de 500 ug/ml indica la existencia de diferencias significativas en la inhibición de la germinación de las semillas evaluadas ($p=0.002$). Con el análisis DMS observamos que los extractos H1 ($p=0.000$) H4 ($p=0.001$) H8 ($p=0.007$) presentan una inhibición de la germinación en comparación con el control (Anexo 11). En el gráfico 3.6 se puede apreciar las medianas de cada uno de los grupos de datos comparados. Los extractos H1, H4, H8 tienen una mediana significativamente menor al control, mientras que los extractos H13 y H16 no

presentan diferencias significativas con respecto a la mediana del control de crecimiento.

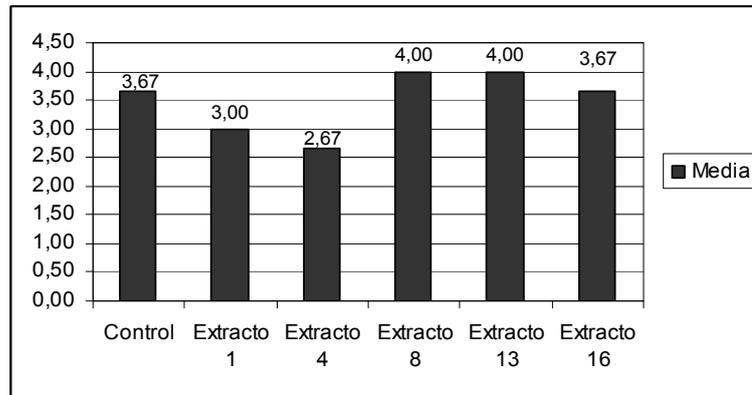
Gráfico 3.6 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L. para extractos a una concentración de [1000 ug/ml].



Extractos a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Triticum aestivum* L.

El bio ensayo a una concentración de 500 ug/ml presenta Chi-2 de 16.363 que en relación al valor tabulado de 11.070 indica que los extractos inhiben la germinación de las semillas en comparación con el control. (Anexo 12) El gráfico 3.7 se hace una comparación de las medias de los grupos comparados, indicando que las semillas tratadas con los extractos H1 y H4 tienen una media significativamente menor al control, e inhiben la germinación, en relación al control de crecimiento.

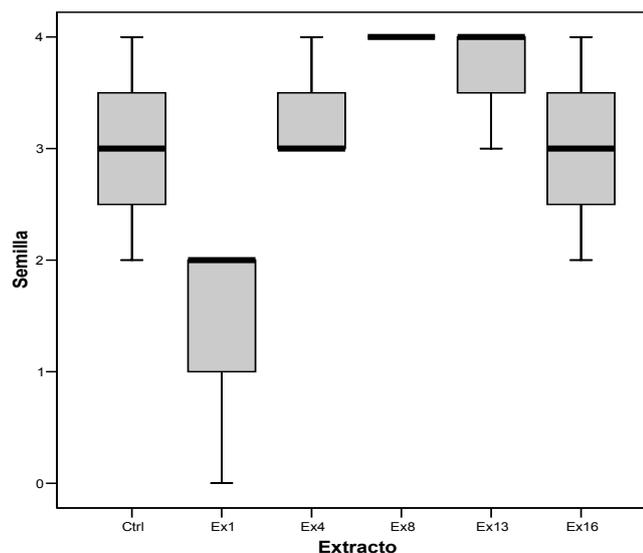
Gráfico 3.7 Comparación de la media aritmética de la actividad inhibitoria de los extractos en semillas de *Triticum aestivum* L. a una concentración de [1000 ug/ml]



Extractos a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Triticum aestivum* L.

El bio ensayo a una concentración de 1000 ug/ml indica la existencia de diferencias significativas en la inhibición de las semillas evaluadas ($p= 0.025$) Con un análisis DMS observamos que el extracto 1 presentan una inhibición significativamente menor en comparación con el control $p= 0.028$ (Anexo 13). El gráfico 3.8 se puede apreciar las medianas de cada uno de los grupos de datos comparados. El extracto H1 presenta una mediana menor al control indicando que este extracto tiene propiedades que inhiben la germinación de las semillas tratadas.

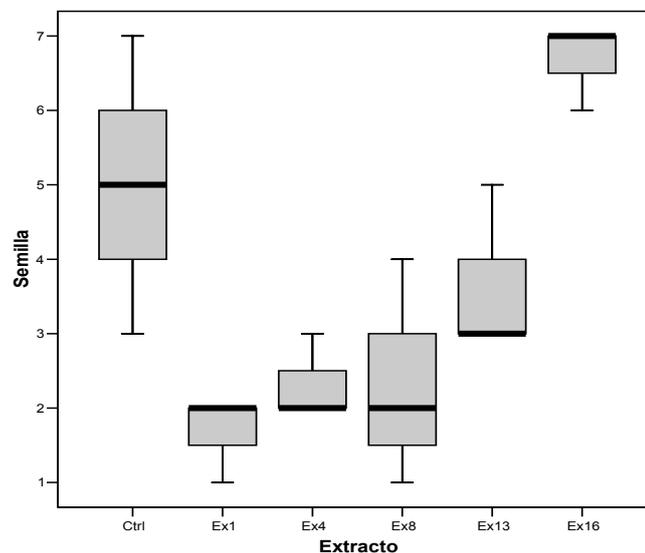
Gráfico 3.8 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de *Triticum aestivum* L. para extractos a una concentración de [1000 ug/ml].



Extractos a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Rumex crispus* L.

El bio ensayo a una concentración de 500 ug/ml indica la existencia de diferencias significativas en la inhibición de la germinación de las semillas evaluadas ($p= 0.02$) Con el análisis DMS observamos que los extractos H1 ($p= 0.05$) H4 ($p=0.019$) H8 ($p= 0.019$) presentan una inhibición de la germinación en comparación con el control (Anexo 14) En el gráfico 3.9 se puede apreciar las medianas de cada uno de los grupos de datos comparados. Los extractos H1, H4, H8 tienen una media significativamente menor al control, mientras que los extractos H13 Y H16 no presentan diferencias significativas con respecto a la mediana del control de crecimiento.

Gráfico 3.9 Boxplot de la actividad inhibitoria de la germinación de semillas de *Rumex crispus* L. para extractos a una concentración de [500 ug/ml].



Extractos a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Rumex crispus* L.

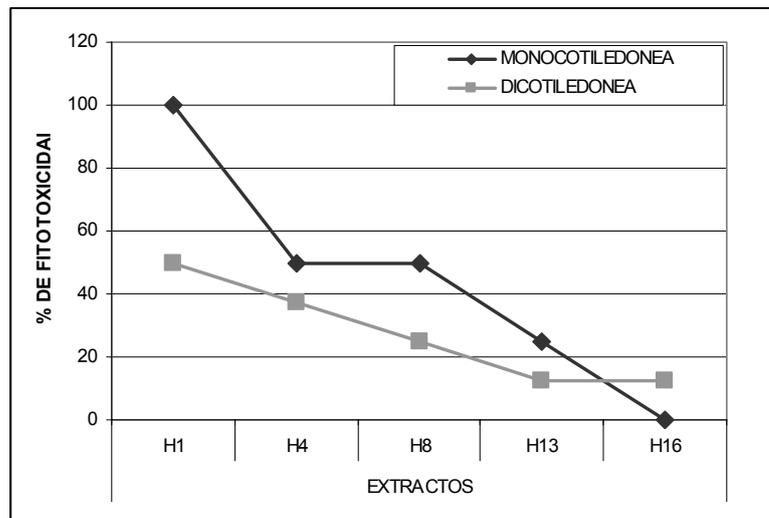
El bio ensayo a una concentración de 1000 ug/ml indica que no existe diferencias significativas en la inhibición de la germinación de las semillas evaluadas con un valor $p= 0.158$ (Anexo 15).

3.1.6 Resultados generales

Obtención de cepas bio controladoras

El sitio que presento la cepa bio controladora con mayor actividad fitopatógica es la muestra colectada en suelo con cultivo de oca (H1), seguida de las muestras obtenidas del suelo arado (H4, H8, H13) y H16 muestra colectada en un pastizal. En el gráfico 3.10 se observa la actividad fitotoxicidad sobre las semillas evaluadas como dicotiledóneas a (*L. sativa* y *R. crispus*) y monocotiledóneas a (*T. aestivum*).

Gráfico 3.10 Porcentaje de Fitotoxicidad de los extractos evaluados en los bio ensayos.



ACTIVIDAD FITOTÓXICA PRE EMERGENTE

Extracto uno

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500] ug/ml, se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L. y *Rumex crispus* L. A una concentración de [1000] ug/ml inhibe la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L. y *Lactuca sativa* L. (Gráfico 3.11).

Extracto cuatro

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500 ug/ml], se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L. A una concentración de [1000 ug/ml] no presenta ninguna actividad fitotóxica (Gráfico 3.11).

Extracto ocho

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500 ug/ml], se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L. A una concentración de [1000 ug/ml] inhibe la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L. (Gráfico 3.11).

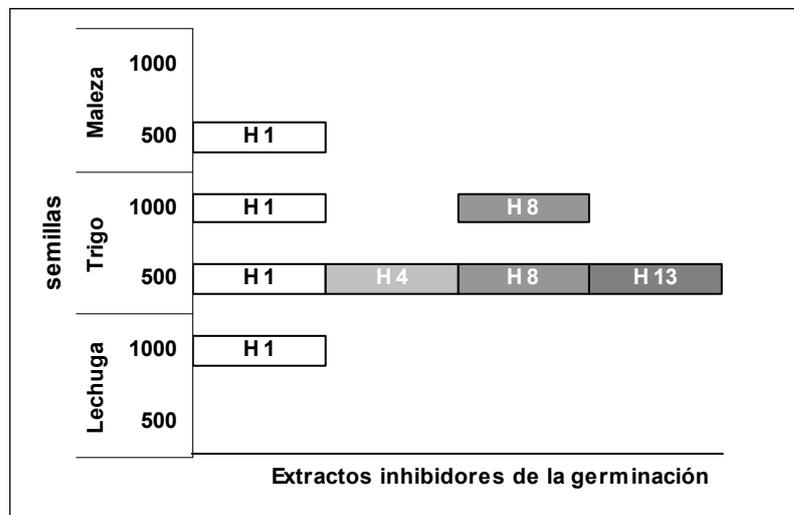
Extracto trece

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500 ug/ml], se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L. A una concentración de [1000 ug/ml] no presenta ninguna actividad fitotóxica (Gráfico 3.11).

Extracto diez y seis

No presenta ninguna actividad fitotóxica a concentraciones de [500 ug/ml] ni [1000 ug/ml] (Gráfico 3.11).

Gráfico 3.11 Actividad fitotóxica pre emergente en la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Rumex crispus* L.



ACTIVIDAD FITOTÓXICA POS EMERGENTE

Extracto uno

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500 ug/ml], se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L y *Rumex crispus*

L. A una concentración de [1000 ug/ml] inhibe la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L. y *Lactuca sativa* L. (Gráfico 3.12).

Extracto cuatro

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500 ug/ml], se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Rumex crispus* L. A una concentración de [1000 ug/ml] inhibe la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L. (Gráfico 3.12).

Extracto ocho

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500 ug/ml], se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Rumex crispus* L. A una concentración de [1000 ug/ml] inhibe la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L. (Gráfico 3.12).

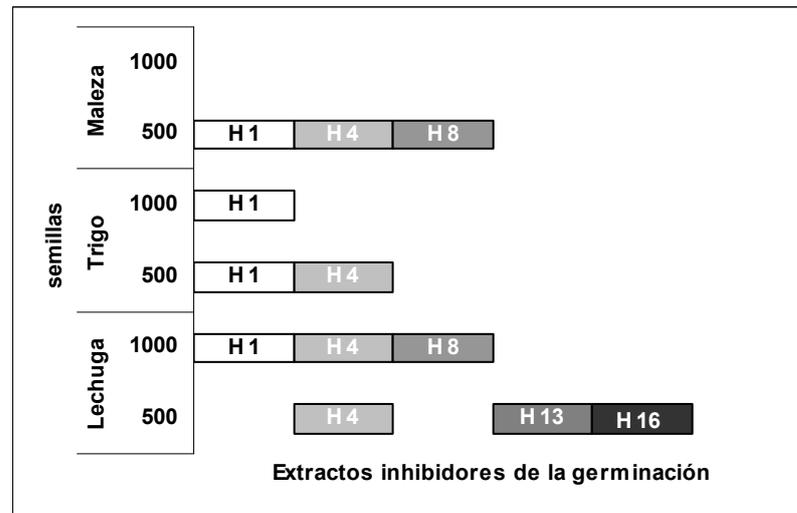
Extracto trece

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500 ug/ml], se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L. A una concentración de [1000 ug/ml] no presenta ninguna actividad fitotóxica (Gráfico 3.12).

Extracto diez y seis

La actividad fitotóxica, a una concentración de [500 ug/ml], se manifiesta como la inhibición de la germinación de las semillas de *Lactuca sativa* L. A una concentración de [1000 ug/ml] no presenta ninguna actividad fitotóxica (Gráfico 3.12).

Gráfico 3.12 Actividad fitotóxica pos emergente en la germinación de semillas de *Lactuca sativa* L., *Triticum aestivum* L., *Rumex crispus* L.

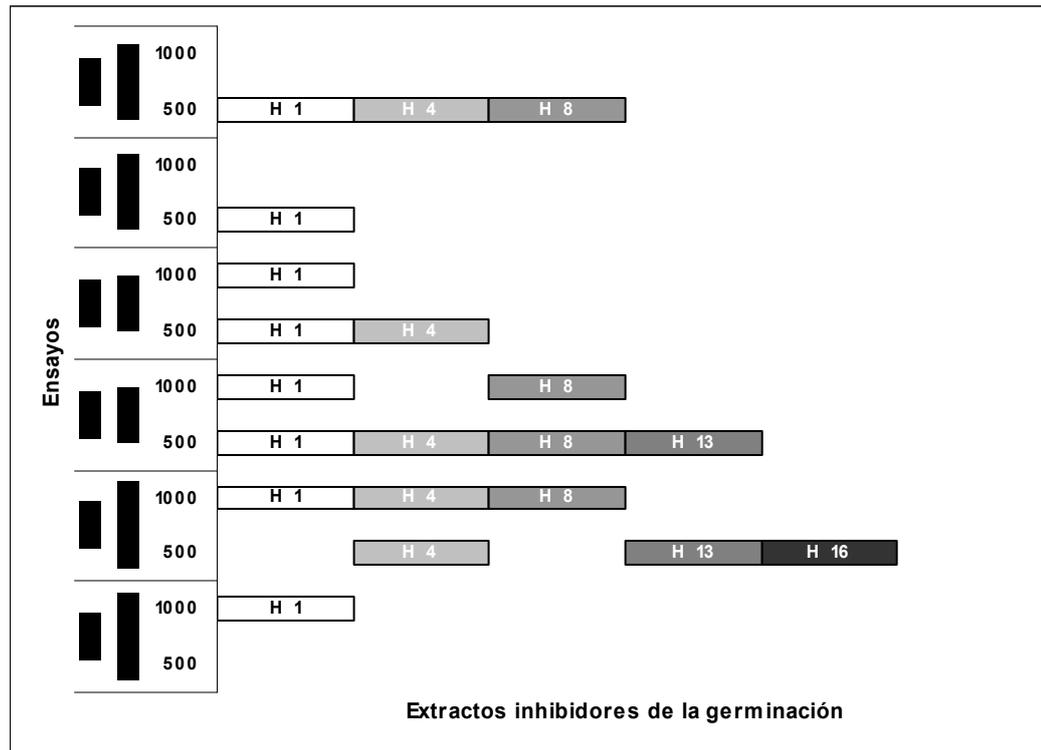


3.2 Discusiones

3.2.1 Fitotoxicidad en semillas de Lechuga, trigo y maleza

La fitotoxicidad de los extractos H1, H4, H8, H13 y H16 (Anexo 16), medida como la inhibición de la germinación del epicotilo de las semillas de lechuga, maleza (dicotiledóneas) y trigo (monocotiledónea) presentan diferentes comportamientos. En el gráfico 3.13 se indica la actividad fitotóxica de los extractos evaluados en todo el bio ensayo, los cuales son discutidos según el momento de aplicación y las concentraciones utilizadas para cada extracto.

Gráfico 3.13 Actividad fitotóxica pre y pos emergente en la germinación de semillas de lechuga, trigo y maleza.



Extracto uno

Los ensayos de fitotoxicidad del extracto uno en semillas de monocotiledóneas y dicotiledóneas presenta una actividad inhibitoria, de la germinación del epicotilo, correspondiente a un 66.66% para 4 de 6 ensayos de pre emergencia y un 66.66% para 4 de 6 ensayos de pos emergencia; es decir un 66.66% de control inhibitorio de la germinación de las semillas para todo el bio ensayo.

En las pruebas de fitotoxicidad de *Lactuca sativa* L. el extracto uno inhibe la germinación del epicotilo a concentraciones de [1000 ug/ml] para aplicaciones pre y pos emergentes; para *Rumex crispus* L. la inhibición de la germinación del epicotilo se produce a concentraciones de [500 ug/ml] para aplicaciones pre y pos emergentes.

Para las semillas de *Triticum aestivum* L. el extracto uno inhibe completamente la germinación de las semillas en ambas aplicaciones y concentraciones.

En las pruebas de fitotoxicidad de pre y pos emergencia para semillas de *Lactuca sativa* L. a una concentración de [500 ug/ml] y *Rumex crispus* L. a una concentración de [1000 ug/ml] el extracto uno no presenta ninguna actividad fitotóxica en la germinación del epicotilo; para los otros ensayos el extracto uno inhibe la germinación del epicotilo.

Extracto cuatro

Los ensayos de fitotoxicidad del extracto 4 en semillas de monocotiledóneas y dicotiledóneas presenta una actividad inhibitoria, de la germinación del epicotilo, correspondiente a un 16.66% para uno de 6 ensayos de pre emergencia y un 66.66% para 4 de 6 ensayos de pos emergencia, es decir un 41.66% de control inhibitorio de la germinación de las semillas para todo el bio ensayo.

En las pruebas de fitotoxicidad de *Lactuca sativa* L. el extracto 4 inhibe la germinación del epicotilo a concentraciones de [500 ug/ml] y [1000 ug/ml] para aplicaciones pos emergentes; es decir que el efecto inhibitorio ocurre cuando el extracto es aplicado una vez germinada la semilla.

En aplicaciones pre emergentes y pos emergentes a una concentración de [500 ug/ml] el extracto 4 inhibe la germinación de las semillas de *Triticum aestivum* L.; este efecto inhibitorio no ocurre en las aplicaciones pre y pos emergentes a una concentración de [1000 ug/ml]. La aplicación a una concentración de [1000 ug/ml] no tiene ningún efecto positivo para los ensayos pre y pos emergencia; el efecto inhibitorio ocurre a una concentración [500 ug/ml].

En semillas de *Rumex crispus* L. el efecto inhibitorio únicamente se presenta en la aplicación pos emergente a una concentración de [500 ug/ml].

Extracto ocho

Los ensayos de fitotoxicidad en semillas de monocotiledóneas y dicotiledóneas el extracto ocho presenta una actividad inhibitoria, de la germinación del epicotilo, correspondiente a un 33.33 % para 2 de 6 ensayos de pre emergencia y un 33.33 % para 2 de 6 ensayos de pos emergencia, es decir un 33.33% de control inhibitorio de la germinación de las semillas para todo el bio ensayo.

En semillas de *Lactuca sativa* L. el efecto inhibitorio únicamente se presenta a la aplicación pos emergente a una concentración de [1000 ug/ml].

En las pruebas de fitotoxicidad de *Triticum aestivum* L. el extracto 4 inhibe la germinación del epicotilo a concentraciones de [500 ug/ml] y [1000 ug/ml] para aplicaciones pre emergentes; es decir que el efecto inhibitorio ocurre cuando el extracto es aplicado antes que germine la semilla.

En semillas de *Rumex crispus* L. el efecto inhibitorio únicamente se presenta a la aplicación pos emergente a una concentración de [500 ug/ml].

Extracto trece

Los ensayos de fitotoxicidad en semillas de monocotiledóneas y dicotiledóneas el extracto trece presenta una actividad inhibitoria, de la germinación del epicotilo, correspondiente a un 16.66 % para 1 de 6 ensayos de pre emergencia y un 16.66% para 1 de 6 ensayos de pos emergencia, es decir un 16.66% de control inhibitorio de la germinación de las semillas para todo el bio ensayo.

En semillas de *Lactuca sativa* L. el efecto inhibitorio únicamente se presenta a la aplicación pos emergente a una concentración de [500 ug/ml].

En semillas de *Triticum aestivum* L. el efecto inhibitorio únicamente se presenta a la aplicación pre emergente a una concentración de [500 ug/ml].

En semillas de *Rumex crispus* L. no existe efecto inhibitorio de germinación en las aplicaciones pre y pos emergentes a concentraciones de [500 ug/ml] y [1000 ug/ml]

Extracto dieciséis

Los ensayos de fitotoxicidad en semillas de monocotiledóneas y dicotiledóneas el extracto trece presenta una actividad inhibitoria, de la germinación del epicotilo, correspondiente a un 0.00% para 0 de 6 ensayos de pre emergencia y un 16.66% para 1 de 6 ensayos de pos emergencia, es decir un 8.33% de control inhibitorio de la germinación de las semillas para todo el bio ensayo.

En semillas de *Lactuca sativa* L. el efecto inhibitorio únicamente se presenta a la aplicación pos emergente a una concentración de [500 ug/ml].

En semillas de *Triticum aestivum* L. y *Rumex crispus* L. no existe efecto inhibitor de germinación en las aplicaciones pre y pos emergentes a concentraciones de [500 ug/ml] y [1000 ug/ml]

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El análisis de la aplicación de los metabolitos secundarios como posibles agentes fitotóxicos naturales, presentan una amplia diversidad de comportamientos que, a pesar de inhibir la germinación no se ha encontrado un extracto que inhiba únicamente la germinación de maleza y permita la germinación de los cultivos.

No existe una especificidad de acción entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, un 45 % de los resultados obtenidos son extractos que afectaron a las semillas de *Triticum aestivum* L. (monocotiledónea) y un 55 % afectaron a las semillas de *Lactuca sativa* L. y *Rumex crispus* L. (dicotiledóneas) por lo que no se puede determinar que los metabolitos secundarios evaluados tengan una especificidad sobre el control de malezas de hoja ancha (*Rumex crispus* L.)

Lo importante de destacar son los resultados similares obtenidos en otras investigaciones (Gutiérrez, 2006, Mosquera y Duran, 2007,) en donde los metabolitos secundarios inhiben la germinación de semillas, lo que nos permite determinar que efectivamente presentan propiedades fitotóxicas, faltando por realizar más ensayos que nos permitirán establecer la actividad herbicida específica fundándose en el fraccionamiento de los extractos, técnica que por ahora no se puede desarrollar en nuestros laboratorios.

El análisis de la actividad fitotóxica de metabolitos secundarios abre una gran posibilidad a futuro de utilizar organismos propios de cada cultivo como una alternativa al manejo, control y prevención de malezas, a más de trabajar con organismos autóctonos (hongos) ya establecidos y adaptados a las condiciones ambientales que toleran productos químicos que son aplicados en los distintos cultivos.

Esta alternativa promueve cambios en el campo de la investigación científico tecnológica, que si bien, en el Ecuador es un campo incipiente, se presenta como una posibilidad promisoría por la alta diversidad de organismos presentes en el país que pueden brindar una alternativa al agro ecuatoriano y mejorar, con otras estrategias, la baja productividad producción de los cultivos en el país, que es el resultado del bajo nivel de aplicación de innovaciones tecnológicas; el uso de paquetes tecnológicos no acordes al suelo, clima y realidades socioeconómicas de

los productores; y, por el divorcio secular entre los centros de investigación y entidades.

Por estas razones y por la demanda de encontrar productos más amigables con el medio ambiente que eviten efectos secundarios, la aplicación de los metabolitos secundarios como control de malezas en cultivos abre un abanico de posibilidades ciertas a mediano y largo plazo.

Se recomienda para futuras investigaciones en esta línea de trabajo, tomar en cuenta el limitante que significa trabajar con un bajo rendimiento de extractos crudos obtenidos a partir de cultivos sólidos, que no permite realizar mayor número de repeticiones y el tiempo que se emplea en todo el proceso desde el aislamiento hasta realizar los bio ensayos.

Las pruebas de germinación, de malezas, presentaron un reto en la investigación, debido a su estrategia de supervivencia (R) que permite generar miles de semillas de las cuales no todas germinaran pero si asegurar su diseminación y germinación. El encontrar la técnica de germinación, para *Rumex crispus* L., en laboratorio es un aporte que se describe en esta investigación que a pesar de no ser superior a un 80% permitió evaluar la actividad herbicida de los extractos; técnicas que pueden ser mejoradas con mayor numero de repeticiones o investigaciones encaminadas únicamente a la investigación de germinación de semillas en condiciones ex situ.

Finalmente, se describe la alta actividad fitotóxica del extracto H1 que a pesar de no ser específico presenta una inhibición de la germinación del epicotilo del 100% en aplicaciones pre y pos emergentes para una monocotiledonea, el cual puede seguir siendo investigado y servir como un posible bioherbicida que promueva el uso de productos biológicos y mejorar el sistema agrícola a diferentes escalas.

BIBLIOGRAFÍA

- ABATE, D. 1989. **Bioactive metabolites from fermentation cultures of Ethiopian basidiomycetes.** Tesis Doctoral. Universidad de Kaiserslautern. Alemania. pp. 18-19.
- ARIAS J., TREJOS R., VALLEJO S. 2005. **La real contribución de la Agricultura a la economía del país.** Elaborado por el ICCA/2005 (en línea) < <http://www.iica.int/Prensa/Comuniica/2005/n4-esp/Pdfs/n4.pdf>> Consulta. 9 de enero del 2007)
- BELTRAN, L. 1997. **La alelopatía ¿Ciencia o Fenómeno?** Cultivos tropicales. 18: 47-58.
- CARRERO, J. 1996. **Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales.** Ediciones Mundi Prensa. Madrid. pp. 77.
- CAZAR, M. 2006. **Fungicidas y Bactericidas de Microorganismos de suelo.** Tesis doctoral. Universidad de Talca. Talca-Chile.
- CHAVEZ, L., VALVERDE, B., GARITA, L. 1994. **Resistencia del pasto Honduras (*Ixophorus unisetus*) a herbicidas inhibidores de la sintetasa del acetolactato.** Resúmenes V Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas. San José, Costa Rica, p. 197.
- CHRISTENSEN, M. 1994. **The dilution plate technique for isolation of soil microfungi** (en línea), www.cc.edu/~jclausz/msamannual/diltq.html (visitada en marzo de 2005) en Stadler, M., Anke, H. New nematicidal and antimicrobial compounds from the basidiomycete *Cheimonophyllum candidissimum* (Berk & Curt.) SING. I. Producing organism, fermentation, isolation, and biological activities. *The Journal of Antibiotics* 47, 1284 – 1289. (1994).
- COLLADO, L., ALEU, G., HERNANDEZ-GALAN, J., DURAN-PATRON, R., 2000. ***Botrytis* species: an intriguing source of metabolites with a Wide range of biological activities. Structure, chemistry and bioactivity of metabolites isolated form *Botrytis* species.** *Current Organic Chemistry* 4, 1261-1286. En M. GUTIERRES. 2006. Metabolitos secundarios de los hongos fitopatógenos *Chondrostereum purpureum* y *Nectria galligena*: actividad antimicrobiana y herbicida. Tesis doctoral. Universidad de Talca. Talca-Chile.
- CUTLER, H., CUTLER, S. 1999. **Biological active natural - products Agrochemicals.** Horace G. Cutler y Stephen J. Cutler, editors. CRC Press. Pp. 1-14.
- DERACHE, R. 1990. **Toxicología y seguridad de los alimentos.** Ediciones Omega S.A. Barcelona España. pp. 220.
- DEVINE, M. D., PRESTON, C. 2000. **The molecular basis of herbicide resistance.** pp. 72-104. En: Cobb, A.H. & Kirkwood, R.C., eds. *Herbicides and their mechanisms of action.* Sheffield Academic Press Ltd, Inglaterra.

- ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO (ESPOCH). 2004 Investigaciones ESPOCH. Area de Productos Naturales. Laboratorio de Fitoquímica(en línea) www.esPOCH.edu.ec/servicios/hongos/investigaciones.html Consultada: 28 de marzo del 2005.
- FERNANDEZ, C., GARCIA L. 1989. **Interferencias entre las malas hiervas y los cultivos**. pp 73-88, en: L. García Torres y C. Fernandez – Quintanilla (eds), Fundamentos sobre las malas hierbas y herbicidas. MAPA, SEA Y Mundi-Prensa, Madrid.
- GUTIÉRREZ, S., Casqueiro, J., Martin, J. 2000. **Los Hongos como factorias celulares: Biodiversidad de metabolitos secundarios**. Revista Iberoamericana de Micología Vol 17, España. pp S54-S60 (en línea) <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S54S60.pdf> Consultada: 17 de abril del 2007.
- GUTIÉRREZ, M. 2006. **Metabolitos secundarios de los hongos fitopatógenos *Chondrostereum purpureum* y *Nectaria galligena*: actividad antimicrobiana y herbicida**. Tesis doctoral. Universidad de Talca. Talca-Chile.
- HEAP, L., LE BARON, H. 2001. **Introduction and overview of resistance**. pp. 1-22, En: S. B. Powles & Shaner, D.L., eds. Herbicide resistance in world grains. CRC Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos de América. (en línea) < <http://books.google.com.ec/books?id0eXVnpH5FAV0C&vq0Herbicide+resistance+in+world+grains#PPA.M1>> Consultada: 9 de diciembre del 2007.
- HYYÖNEN, T., SALONEN, J. 2002. **Weed species diversity and community composition in cropping practices at two intensity levels - a six-year experiment**. Plant Ecology 154:73-81
- ITOH, K., AZMI, M., AHMAD, A. 1992. **Paraquat resistance in *Solanum nigrum*, *Crassocephalum crepidioides*, *Amaranthus lividus* and *Conyza sumatrensis* in Malaysia**. Proc. 1st Int. Weed Control Congress, Melbourne, Australia, 17-21 February, 1992. 2: 224-228.
- JASIENIUK, M., BRÛLÉ-BABEL, A., MORRISON, L. 1996. **The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds**. Weed Sci. 44: 176-193.
- KLINGMAN, G. 1966. **Weed control as a science**. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 421 pp
- KUSANO, M., NAKAGAMI, K., FUJIOKA, S., KAWANO, T., SHIMADA, A., KIMURA, Y. 2003. **$\beta\gamma$ -Dehydrocurvularin and related compounds as nematicides of *Pratylenchus penetrans* form the fungus *Aspergillus* sp.** Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 67, 1413-1416.
- LEVIN, D. 2001. **The recurrent origin of plant races and species**. Systematic Botany 26: 197-204.
- LIGON, J. **Enhancing biocontrol agents**. Pesticide Outlook. 12, 175 – 176. (2000).

- MACÍAS, A. MOLINILLO, J., GALINDO, J., VARELA, R. 1999. **Terpenoids with Potencial Use as Natural Herbicide Templades**. En CUTLLER, H., CUTLLER, S. 2001. *Biologically active natural products: Agrochemical*. Crc Press. pp: 12-29.
- MACÍAS, F., VARELA, R., SIMONET, A., CUTLER, H., CUTLER, S. 2000. **Bioactive carotenes from *Trichoderma virens***. *Journal of Natural Products* 63, 1197 – 1200.
- MEROTTO, A., VIDAL, R., FLECK, N. 1999. **Soybean tolerance to synthetic auxin and potential of mixtures with protox-inhibiting herbicides**. *Proc. British Crop Protection Conference - Weeds* 1: 319-324.
- MONTE, E. **Control biológico del pie negro de la remolacha azucarera mediante una formulación industrial con *Trichoderma harzianum***. I congreso de la sociedad española de agricultura ecológica. Toledo, septiembre de 1994. (en línea) <http://www.agroecologia.net/congresos/toledo/29.pdf> Consultada: 4 de junio de 2006.
- MORENO, R. 2001. **Soybean weed management in Argentina** [abstract]. En: *Abstracts of the Third Int. Weed Sci. Congress, 2000 June 6-11; Foz do Iguassu, Brazil*, pp. 520. CD-ROM. Disponible en *Int. Weed Science Society, Oxford, MS, Estados Unidos de América*.
- MORTENSEN, D., BASTIAANS, L., SATTIN, M. 2000. **The role of ecology in the development of weed management systems: an outlook**. *Weed Res.* 40: 49-62
- POWLES, S. 1997. **Success from adversity: herbicide resistance can drive changes to sustainable weed management systems**. *Proc. Brighton Crop Protection Conference - Weeds*.3: 119-1126.
- POWLES, S., SHANER, D. 2001. **Herbicide resistance in world grains**. CRC Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos de América. 308 pp.
- PRESTON, C., POWLES, S. 2002. **Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum***. *Heredity* 88: 8-13.
- PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR (PUCE)., CENTRO DE ESTUDIOSLATINOAMERICANOS (CELA) (200-). *Producción masiva de microorganismos benéficos para la agricultura*. Quito-Ecuador (en línea) http://www.fondoambiental.gov.ec/site/download/prj/prj_15.pdf. Consultada: 9 de diciembre del 2007.
- RETZINGER, E., MALLORY-SMITH, C. 1997. **Classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies**. *Weed Tech.*11: 384-393.
- REZNICK, D., CAMERON, K. 2001. **The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution**. *Genetica* 112-113: 183-198
- RINCÓN, D. 1968. **Ensayos preliminares con el herbicida simazín en algunos cultivos**. Servicios Shell para el Agricultor Cagua, Venezuela.pp. 8

- RODOSEVICH, S., 1987. **Methods to study interactions among crops and seeds.** Weed Tech., 1: 190-198
- RODRÍGUEZ, E. 2000. **Protección y sanidad vegetal – Combate y control de malezas en Maíz en Venezuela.** Editopres Humberto Fontana N. y Carlos González N. (en línea) <<http://www.plagas-agricolas.info.ve/doc/html/tineo.html>> consultada: 4 de junio de 2007.
- SHIBAIKE, H., UCHINO, A., ITOH, K. 1999. **Genetic variation and relationships of herbicide-resistant and -susceptible biotypes of *Lindernia micrantha*.** Proc. Brighton Crop Protection Conference - Weeds 1: 197-202.
- SMITS, J., RINZEMA, A., TRAMPER, J., VAN SOONSBECK, H., KNOL, W. 1996. **Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* Q9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production and kinetics.** Applied Microbiology and Biotechnology 46, 489 – 496.
- Sierra, R. 1999. **Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental.** Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y Ecociencia. Quito-Ecuador.
- TURNER, G. 2000. **Exploitation of fungal secondary metabolites old and new.** Microbiology Today, 27, 118 – 120.
- URBANO, P., 1999. **La producción vegetal en el marco de las medidas agroambientales.** Vida rural, 87: 44-46
- URBANO, P., 2002. **Fitotecnia. Ingeniería de la Producción vegetal.** Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona. España. pp 425
- VALLEJO S. 2002. **Perfil del sector agropecuario ecuatoriano. Proyecto SICA-MAG.** Elaborado por el ICCA/2002. (en línea) <http://www.sica.gov.ec/agro/docs/agro/docs/perfil1998-2002.pdf> consultada en: 16 de Febrero del 2007.
- VALVERDE, B. 1994. **Manejo de la resistencia a los herbicidas en los países de desarrollo.** pp. 77. En LABRADA, R. 2004. Manejo de malezas para países en desarrollo. Addendum 1. Organización de las naciones unidas para ña agricultura y la alimentación. Roma (en línea) <http://www.fao.org/docreo/007/y5031s/y5031s0h.htm#bm13> Consultada en: 18 de octubre del 2006
- VALVERDE, B. 2002. **Weed Management in Latin America.** Pesticide Outlook 13: 79-81 (en línea) http://www.rsc.org/delivery/_ArticleLinking/DisplayArticleForFree.cfm?doi=b203223f&JournalCode=PO. Consultada: 10 de diciembre del 2007.
- VALVERDE, B., RICHES, C., CASELEY, J. 2000. **Prevention and management of herbicide-resistant weeds in rice: Experiences from Central America with *Echinochloa colona*.** Cámara de Insumos Agropecuarios, Costa Rica, pp. 123
- VENEGAS R., MUÑOZ V. 1982. **Como controlar las malezas;** Comunicacion Tecnica; No. 10. Instituto Nacional Autonomo de Investigaciones Agropecuarias, Quevedo (Ecuador). Estacion Experimental Tropical Pichilingue

- VITTA, J., TUESCA, D., PURICELLI, E., NISENSOHN, L., FACCINI, D., LEGUIZAMÓN, E. 2001. **Glyphosate-tolerant soybean and weed management in Argentina: present and prospects** [abstract]. En: Abstracts of the Third Int. Weed Sci. Congress, 2000, June 6-11; Foz do Iguassu, Brazil, pp. 343. CD-ROM. Disponible en Int. Weed Science Society, Oxford, MS, Estados Unidos de América.
- WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. 1983. **Herbicide Handbook of the W.S.S.A.** Fifth edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois, USA. pp. 515
- WRUBEL, R., GRESSEL, J. 1994. **Are herbicide mixtures useful for delaying the rapid evolution of resistance? A case study.** Weed Tech. 8: 635-648.

ANEXOS

Anexo 1. Pruebas de germinación



Semillas de trigo, lechuga y maleza



Pruebas en tierra y papel



Semillas germinadas de lechuga



Semillas germinadas de trigo

Anexo 2. Pruebas de Fitotoxicidad



Cámara húmeda para el bio ensayo



Bio ensayo

Anexo 3. Hongos cultivados para la extracción de los metabolitos secundarios



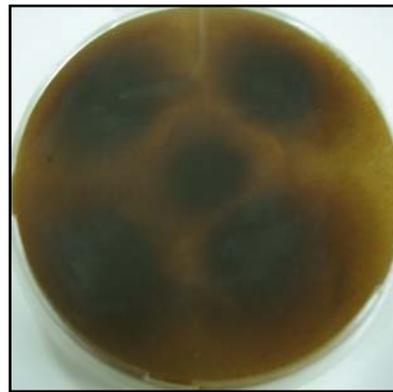
H1 micelio



H1 base



H4 micelio



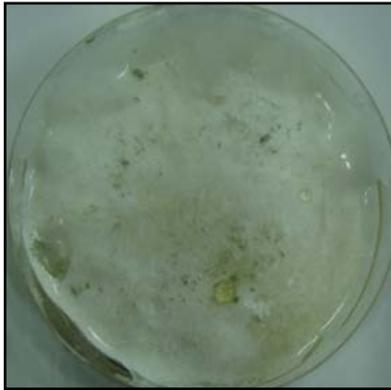
H4 base



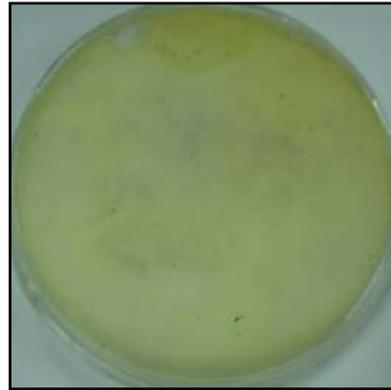
H8 micelio



H8 base



H13 micelio



H13 base



H16 micelio



H16 base

Anexo 4. Anova para bio ensayos de pre emergencia a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Lactuca sativa* L.

Tests of Between-Subjects Effects					
Dependent Variable: Semillas					
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8,444 ^a	5	1,689	1,322	,319
Intercept	1184,222	1	1184,222	926,783	,000
Extracto	8,444	5	1,689	1,322	,319
Error	15,333	12	1,278		
Total	1208,000	18			
Corrected Total	23,778	17			

a. R Squared = ,355 (Adjusted R Squared = ,086)

Anexo 5. DMS para bio ensayos de pre emergencia a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Lactuca sativa* L.

Dependent Variable: Semillas
LSD

(I) Extracto	(J) Extracto	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	Ex1	4,00(*)	1,247	,008
	Ex13	,67	1,247	,603
	Ex16	,00	1,247	1,000
	Ex4	1,67	1,247	,206
	Ex8	2,67	1,247	,054

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

Anexo 6. Chi cuadrado para bio ensayos de pre emergencia a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Triticum aestivum* L.

Germinados			No Germinados		
Observados	Esperados	Chi-2	Observados	Esperados	Chi-2
10	3	16,33333333	2	9	5,44444444
0	3	3	12	9	1
0	3	3	12	9	1
2	3	0,33333333	10	9	0,11111111
0	3	3	12	9	1
7	3	5,33333333	5	9	1,77777778
		31			10,3333333
Chi-2	41,3333333				
gl	5				
Chi-2 teo	11,0705				
alfa	0.5				

Anexo 7. Chi cuadrado para bio ensayos de pre emergencia a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Triticum aestivum* L.

Germinados			No Germinados		
Observados	Esperados	Chi-2	Observados	Esperados	Chi-2
8	7	0,14285714	4	5	0,2
4	7	1,28571429	8	5	1,8
10	7	1,28571429	2	5	1,8
1	7	5,14285714	11	5	7,2
9	7	0,57142857	3	5	0,8
8	7	0,14285714	4	5	0,2
		8,57142857			12
Chi-2	20,5714286				
gl	5				
Chi-2 teo	11,0705				
alfa	0.05				

Anexo 8. DMS para bio ensayos de pre emergencia a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Rumex crispus* L.

Dependent Variable: Semillas
LSD

(I) Extracto	(J) Extracto	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	Ex1	4,00(*)	1,247	,008
	Ex13	,67	1,247	,603
	Ex16	,00	1,247	1,000
	Ex4	1,67	1,247	,206
	Ex8	2,67	1,247	,054

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

Anexo 9. Chi cuadrado para bio ensayos de pre emergencia a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de de *Rumex crispus* L.

	Germinados			No Germinados		
	Observados	Esperados	Chi-2	Observados	Esperados	Chi-2
	10	8	0,5	20	22	0,18181818
	4	8	2	26	22	0,72727273
	7	8	0,125	23	22	0,04545455
	7	8	0,125	23	22	0,04545455
	14	8	4,5	16	22	1,63636364
	6	8	0,5	24	22	0,18181818
			7,75			2,81818182
Chi-2	10,5681818					
gl	5					
Chi-2 teo	11,0705					
alfa	0,05					

Anexo 10. DMS para bio ensayos de pos emergencia a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Lactuca sativa* L.

Dependent Variable: Semilla
LSD

(I) Extracto	(J) Extracto	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	Ex1	1,67	1,089	,152
	Ex13	8,33*	1,089	,000
	Ex16	7,33*	1,089	,000
	Ex4	7,00*	1,089	,000
	Ex8	2,00	1,089	,091

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

Anexo 11. DMS para bio ensayos de posmergencia a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Lactuca sativa* L.

Dependent Variable: Semilla
LSD

(I) Extracto	(J) Extracto	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	Ex1	7,33(*)	1,347	,000
	Ex13	2,67	1,347	,071
	Ex16	2,33	1,347	,109
	Ex4	5,67(*)	1,347	,001
	Ex8	4,33(*)	1,347	,007

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the ,05 level.

Anexo 12. Chi cuadrado para bio ensayos de pos emergencia a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Triticum aestivum* L.

	Germinados			No Germinados			Chi-2
	Observados	Esperados	Chi-2	Observados	Esperados	Chi-2	
	11	11	0	1	1	0	
	9	11	0,36363636	3	1	4	
	8	11	0,81818182	4	1	9	
	12	11	0,09090909	0	1	1	
	12	11	0,09090909	0	1	1	
	11	11	0	1	1	0	
			1,36363636			15	
Chi-2	16,3636364						
gl	5						
Chi-2 teo	11,0705						
alfa	0.5						

Anexo 13. DMS para bio ensayos de pos emergencia a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Triticum aestivum* L.

Dependent Variable: Semilla
LSD

(I) Extracto	(J) Extracto	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	Ex1	1,67(*)	,667	,028
	Ex13	-,67	,667	,337
	Ex16	,00	,667	1,000
	Ex4	-,33	,667	,626
	Ex8	-1,00	,667	,159

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the ,05 level.

Anexo 14. DMS para bio ensayos de pos emergencia a una concentración de [500 ug/ml] en semillas de *Rumex crispus* L.

Dependent Variable: Semilla
LSD

(I) Extracto	(J) Extracto	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Ctrl	Ex1	3,33(*)	,981	,005
	Ex13	1,33	,981	,199
	Ex16	-1,67	,981	,115
	Ex4	2,67(*)	,981	,019
	Ex8	2,67(*)	,981	,019

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the ,05 level.

Anexo 15. Anova para bio ensayos de pos emergencia a una concentración de [1000 ug/ml] en semillas de *Rumex crispus* L.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Semilla

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	22,278 ^a	5	4,456	1,956	,158
Intercept	93,389	1	93,389	41,000	,000
Extracto	22,278	5	4,456	1,956	,158
Error	27,333	12	2,278		
Total	143,000	18			
Corrected Total	49,611	17			

a. R Squared = ,449 (Adjusted R Squared = ,219)

Anexo 16. Extractos evaluados en los bio ensayos de pre emergencia y pos emergencia.



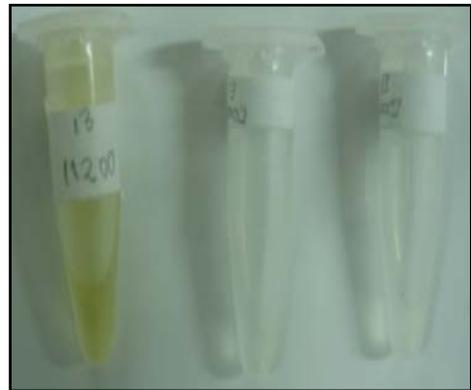
Extracto 1



Extracto 4



Extracto 8



Extracto 13



Extracto 16