



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

“Determinación de la Actividad Molusquicida de dos
Extractos Vegetales sobre Caracol Manzana (*Pomacea
canaliculata*) y su Impacto en la Diversidad de
Artrópodos”.

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del título de:

INGENIEROS AGRÍCOLAS Y BIOLÓGICOS

Presentada por:

Luis Andrés Ochoa Chumaña

José Antonio García Onofre

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2012

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, mi fortaleza, por permitirme concluir este trabajo con salud.

A mis padres, Luis Ochoa y María del Carmen Chumaña por permitirme estudiar en la ESPOL, al brindarme todas las facilidades y ser mi soporte en los momentos difíciles que me ha tocado enfrentar durante mi vida universitaria.

A mi director de tesis Ing. Jorge Paredes y Ph.D. Esther Lilia Peralta, Directora del CIBE, ya que este trabajo no sería el mismo sin su tutoría.

A mis compañeros y amigos Robert Álvarez, Antonio García, Jorge Mendoza, Ricardo Pacheco, Carlos Riera, Víctor García, Marcos Medina y demás amistades con los que he compartido buenos momentos y por el mutuo

apoyo que permitieron que la gran mayoría del grupo salga adelante.

A mis profesores M.Sc. Marcelo Espinosa, M.Sc. Carlos Burbano, M.Sc. Miriam Arias...

Luis Andrés

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias a Dios, por haberme dado la vida para lograr mis objetivos, por ser mi fortaleza y mi guía, además de su infinita bondad y amor

A mi señora madre, Vilma Onofre Córdova, por haberme dado la oportunidad de estudiar en esta institución, por sus consejos, por su ejemplo de perseverancia y constancia, por el cariño y el apoyo incondicional que me brinda cada día, lo que me permite seguir adelante afrontando adversidades ayudándome a ser una persona de bien.

A todos mis compañeros y amigos por el apoyo brindado y por los gratos momentos compartidos en esta etapa universitaria. De manera especial a Jorge Mendoza, Robert Álvarez, Andrés Ochoa, Víctor García, Rosa Rivera, Ricardo Pacheco, Carlos Riera.

A mis profesores M.Sc. Miriam Arias, M.Sc.

Carlos Burbano, M.Sc. Marcelo Espinosa.

Al Ing. Jorge Paredes Montero y Ph.D. Esther

Lilia Peralta, Directora del CIBE, que con su

tutoría e invaluable supervisión me

permitieron culminar de manera exitosa este

trabajo.

...

José Antonio

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado a mis padres Luis Ochoa Calle y María del Carmen Chumaña, a mi hermana Valeria Ochoa y mis abuelos.

A mi amigo, Diego Fuentes, DEP.

Luis Andrés

DEDICATORIA

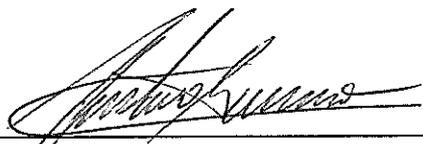
Me gustaría dedicar esta tesis a toda mi familia.

A mi querida mama Vilma, a mis tíos, Washington, Fernando, Carlos, Hilda, Norma, Haydee, Marcia Onofre Córdova, a mi tía Leonor García Yarlaqué.

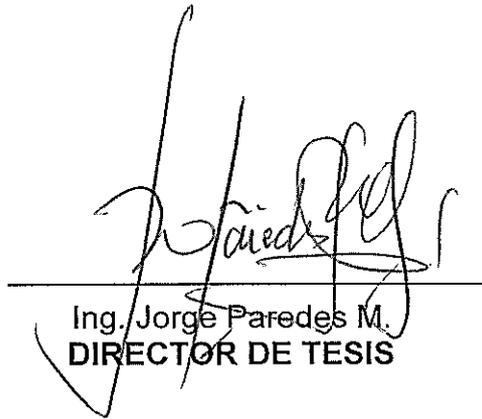
A mi padre Antonio García Yarlaqué, a mis abuelas Emigdia Córdova Vda. de Onofre, Rosa Yarlaqué Vda. de García a mis tíos Luis Onofre Córdova, Rubén Olea Esparza, a mi amigo Diego Fuentes. (EN PAZ DESCANSEN) †

José Antonio.

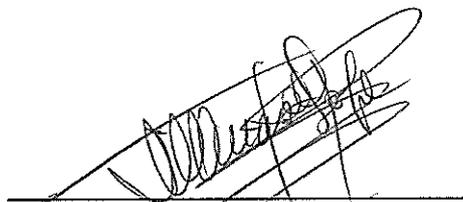
TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Ing. Gustavo Guerrero M.
**DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE**



Ing. Jorge Paredes M.
DIRECTOR DE TESIS



M.Sc. Myriam Arias Z.
VOCAL PRINCIPAL

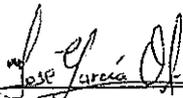
DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, nos corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL ”.

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



Luis Andrés Ochoa Chumaña



José Antonio García Onofre

RESUMEN

La especies invasivas, representan una amenaza para la agricultura, el medio ambiente y la salud pública; desplazando la fauna nativa, reduciendo la biodiversidad y perjudicando los servicios ecosistémicos. De la superficie total sembrada en el Ecuador (aprox. 414,149 hectáreas) alrededor del 48% se encuentra infestada con el molusco plaga y del total producido (aprox. 1706194TM) se pierde el 40% a causa de altas infestaciones, los almácigos infestados son consumidos en un 80 y 100% según explican los productores locales.

Con estos antecedentes se planteó como objetivo general de este trabajo de tesis: determinar la actividad molusquicida de dos especies de plantas silvestres del litoral ecuatoriano para el control del caracol *P. canaliculata* en invernadero y campo, y conocer el impacto de su uso sobre la biodiversidad de artrópodos. Los objetivos específicos que permitieron cumplir el general fueron: 1) Determinar la actividad molusquicida de extractos acuosos de CBE-PAT-FP-001 en condiciones de invernadero y campo, 2) Determinar la actividad molusquicida de extractos etanólicos de CBE-PAT-FP-002 en condiciones de invernadero y campo y 3) Medir el efecto del uso de los extractos sobre la diversidad de artrópodos.

Se empleó el protocolo CBE-PROT-FP-15, que sigue los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud para la búsqueda de plantas con potencial molusquicida. Se emplearon alrededor de 600 caracoles de tres centímetros de longitud colectados en campo, los moluscos, fueron aclimatados por un periodo de 48 horas en peceras de 50x30x50 cm en laboratorio. Cinco concentraciones de extractos vegetales acuosos de CBE-PAT-FP-001 y etanólicos de CBE-PAT-FP-002 fueron evaluadas (150, 250, 500, 750, 1000 ppm), el experimento se replicó cuatro veces. La dosis letal media fue calculada utilizando el software estadístico Kyplot (Versión 2.0 beta 13) de libre acceso en la web.

Las concentraciones probadas en laboratorio fueron evaluadas en campo. Los tratamientos se evaluaron en parcelas de 2 x 2 m y se replicaron 4 veces en un diseño de bloques completos al azar. Se evaluaron los tratamientos 1, 3, 7 y 10 días después de la aplicación. Se determinó que el extracto acuoso de CBE-PAT-FP-001 produce una mortalidad promedio de los caracoles superior al 90%, similar estadísticamente al control ejercido por endosulfán. La mortalidad ocasionada por el extracto etanólico de CBE-PAT-FP-002 en condiciones de laboratorio fue baja, alrededor de 25% (valor máximo). Sin embargo, se observó una inhibición de la actividad de los

caracoles en los ensayos de campo en los que el porcentaje de daño fue bajo al menos en las dos primeras evaluaciones.

Se registró la presencia de las familias: Tetragnathidae y Bracónidae, en todas las unidades experimentales, excepto en las unidades experimentales en las que se aplicó Endosulfán. Esto demuestra y ratifica el impacto ecológico negativo del uso de este producto tóxico. Se explica además de manera científica que el resurgimiento de plagas en el cultivo puede ser ocasionado por la nula presencia de artrópodos benéficos en las parcelas. El índice de diversidad de Margalef más bajo se tabuló con los datos de abundancia de las especies en el tratamiento endosulfán, el testigo absoluto y las concentraciones los extractos vegetales testeados.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	II
ÍNDICE GENERAL.....	V
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Especies Invasivas	3
1.2. <i>P. canaliculata</i> en los cultivos de arroz.....	6
1.3. Impacto económico y ecológico de <i>P. canaliculata</i>	11
1.4. Situación actual de <i>P. canaliculata</i> en el Ecuador	14
1.5. Estrategias de Control	17
1.5.1. Control químico.....	17
1.5.2. Control cultural.....	18
1.5.3. Control biológico.....	23
1.6. Extractos con actividad molusquicida	25
1.7. Los artrópodos como indicadores de impacto ecológico	28
CAPÍTULO 2	
2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. Recolección y procesamiento del material vegetal.....	31
2.2. Elaboración de extractos.....	36
2.3. Bioensayos en laboratorio.....	39
2.4. Bioensayos en campo.....	44

2.5. Medición de la diversidad de artrópodos.....	49
---	----

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1. Elaboración y caracterización de extractos.....	52
3.2. Bioensayos en laboratorio.....	53
3.3. Bioensayos en campo.....	57
3.4. Diversidad de artrópodos.	60

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	64
APÉNDICE.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	76

ABREVIATURAS

PH	Potencial de Hidrógeno
CE	Conductividad eléctrica
P/V	Peso / Volumen
C/V	Concentración / Volumen
CIBE	Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador
H	Horas
”	Segundos
’	Minutos

SIMBOLOGÍA

%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
M	Metros
Mm	Milímetros
cm	Centímetros
m ²	Metros cuadrados
μS	Micro siemens
L	Litros
TM	Toneladas métricas
Ppm	Partes por millón
mgL ⁻¹	Miligramos por litro de agua
CBE-PAT-FP-001	Extracto A
CBE-PAT-FP-002	Extracto B

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.1	Distribución de <i>Pomacea canaliculata</i> en el Ecuador, FUENTE: Agrocalidad, 2011.....	15
Figura 1.2	A) Presentación comercial del endosulfán B) Parcela tratada con endosulfán, la flecha roja señala un anfibio muerto a causa del agro tóxico	18
Figura 2.1	(A) Distribución geográfica de las zonas de recolección. (B) Material vegetal seco de CBE-PAT-FP-001. (C)Material vegetal CBE-PAT-FP-002.....	32
Figura 2.2	(A) Corte de frutos de CBE-PAT-FP-001. (B) Material colocado en la estufa listo para el proceso de secado. (C) Frutos después del secado. (D) Proceso de molido del material seco.....	33
Figura 2.3	(A) Material vegetal de CBE-PAT-FP-002 colocado a temperatura ambiente. (B) Material vegetal seco. (C) Triturado de material vegetal seco. (D) Resultados del proceso manual de trituración.....	35
Figura 2.4	(A) Pesaje del material vegetal pulverizado. (B) Proceso de cocción. (C4) Mezcla resultado de la cocción. (D) Filtrado de la mezcla. (E) Extracto de CBE-PAT-FP-001. (F) Envasado del extracto.....	37
Figura 2.5	(A) Pesaje material vegetal triturado (CBE-PAT-FP-002).(B) Colocación del material en los recipientes. (C)Frascoscon la mezcla (triturado/alcohol etílico al 80%). (D) Proceso de homogenizado de la mezcla.....	38

Figura 2.6	(A) Filtrado de la mezcla homogenizada. (B) Eliminación del solvente en el rotoevaporador.....	39
Figura 2.7	(A) Recolección de caracoles (<i>Pomacea canaliculata</i>)....	39
Figura 2.8	(A) Recolección de caracoles (<i>Pomacea canaliculata</i>). (B) Especímenes en tanque de plástico. (C) Lavado de caracoles. (D) Pecera con especímenes.....	40
Figura 2.9	(A) Viales de polietileno usados para el Bioensayo en el laboratorio. (B) Colocación de diez caracoles por vial. (C) Bioensayo en el laboratorio, viales con las diluciones de extractos (D) Extracto Diluido en el vial con los caracoles (<i>Pomacea canaliculata</i>)	42
Figura 2.10	(A) Evaluación del Bioensayo en el laboratorio. (B) Caracoles muertos descartados. (C) Especímenes (<i>Pomacea canaliculata</i>) colocados en agua destilada. (D) especímenes sobrevivientes después de la segunda evaluación.....	43
Figura 2.11	Ubicación del bioensayo en campo	44
Figura 2.12	(A) Levantamiento de los muros. (B) Construcción de parcelas. (C) Parcela de 2mx2m. (D) Siembra del arroz con el método de trasplante.....	46
Figura 2.13	Figura. 2.13 (A) Área del ensayo sembrada. (B) Infestación de parcelas con caracoles (<i>Pomacea canaliculata</i>). (C) Extractos y bombas para la aplicación. (D) Aplicación de los extractos según la dosis por tratamiento. (E) Evaluación del daño en las parcelas. (F) Daño causado por el caracol manzana (<i>Pomacea canaliculata</i>)	48

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Manejo integrado de <i>Pomacea canaliculata</i> en diferentes etapas del cultivo de arroz.....	21
Tabla 2	Actividades de los agricultores, posibles opciones, sus efectos y posible aceptación de los granjero.....	22
Tabla 3	Tratamientos probados en el bioensayo en campo.....	44
Tabla 4	Resultados de pruebas serológicas a material vegetal sintomático de las zonas de Taura, Pedro Carbo y Santa Elena.....	46
Tabla 5	Distribución de los tratamientos en el área del experimento.....	54
Tabla 6	Ph y Conductividad eléctrica.....	56
Tabla 7	Comparación del Porcentaje de daño en cada dosis	60

INTRODUCCIÓN

El caracol manzana (*Pomacea canaliculata*) es considerado una de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo. En Ecuador se lo observó por primera vez en el 2005, causando daños en el cultivo de arroz. Alrededor del 48% de la superficie total sembrada en el Ecuador (Aprox. 414,149 hectáreas) se encuentra infestada con el molusco plaga y del total producido (aprox. 1706193 TM) se pierde el 40% a causa de altas invasiones.

Por otro lado, la proliferación de esta especie constituye un riesgo nacional para la salud pública del país, estudios recientemente realizados por Martini, et.al. demuestran que el caracol manzana es portador (huésped intermediario) del nematodo *Angiostrongylus cantonensis*, agente causal de la meningoencefalitis eosinofílica en humanos. Tres muertes y alrededor de cincuenta casos han sido diagnosticados con esta enfermedad, tan solo en seis años desde la supuesta introducción del molusco al Ecuador [10].

El problema se agrava debido a que para el control, los productores aplican dosis altas de insecticidas organoclorados (Endosulfán + Methomyl) provocando resistencia de plagas tradicionales del cultivo, eliminación de organismos benéficos y el resurgimiento de problemas fitosanitarios.

El papel de los compuestos químicos presentes en las plantas y su utilización como plaguicidas ha sido establecido por numerosos autores y cuenta

adicionalmente con el aval de conocimientos ancestrales. Especies de familias de plantas como *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae*, *Ranunculaceae* y *Solanaceae* son bien conocidas por sus principios activos, con actividad insecticida y fungicida [42]. Los esfuerzos para la erradicación de los moluscos en el mundo, han estado encaminados a la búsqueda de nuevos compuestos a partir de extractos vegetales con actividad molusquicida [41, 54, 58]. Así, se planteó objetivo general de este trabajo de tesis: determinar la actividad molusquicida de dos especies de plantas silvestres del litoral ecuatoriano para el control del caracol *Pomacea canaliculata* en invernadero y campo, y conocer el impacto de su uso sobre la biodiversidad de artrópodos.

Los objetivos específicos que permitieron cumplir el general fueron: 1) Determinar la actividad molusquicida de extractos acuosos de CBE-PAT-FP-001 en condiciones de invernadero y campo, 2) Determinar la actividad molusquicida de extractos etanólicos de CBE-PAT-FP-002 en condiciones de invernadero y campo y 3) Medir el efecto del uso de los extractos sobre la diversidad de artrópodos.

CAPÍTULO 1

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Especies Invasivas

El cambio climático y las especies invasivas son dos de las mayores amenazas a la biodiversidad y a la provisión de recursos del ecosistema. Los daños estimados de las especies invasoras en todo el mundo asciende a más de \$ 1,4 billón por año - el 5% de la economía global, con impactos en una amplia gama de sectores como la agricultura, silvicultura, la acuicultura, el transporte, el comercio, la generación de energía y la recreación [1].

En términos ambientales, las islas, por ejemplo, con su única y variada biodiversidad han sufrido de manera desproporcionada

la incidencia de las especies invasoras, que son responsables de aproximadamente dos tercios de todas las extinciones de especies [2].

La evidencia de la influencia del cambio climático sobre los efectos devastadores de las especies invasivas crece con rapidez. Impactos del cambio climático, tales como aumento de las temperaturas y los cambios en las concentraciones de CO₂, pueden incrementar las oportunidades de las especies invasivas de sobrevivir, debido a su adaptabilidad a las perturbaciones y a una variedad más amplia de condiciones biogeográficas [4]. Los impactos de las especies invasivas pueden ser más graves, bajo el principio de que compiten por recursos cada vez menores como el agua; las temperaturas más cálidas de aire y el agua también pueden facilitar el movimiento de las especies por vías de propagación que antes eran inaccesibles, tanto naturales como provocados por el hombre[4].

Las especies invasoras externas son viajeras inconscientes que han sido trasladadas, intencionalmente o por accidente, de una región del planeta a otra. Libres de competidores, enfermedades o depredadores naturales, algunas veces estas

especies prosperan en su nuevo hábitat, transformando ecosistemas enteros, en donde tienen el potencial de provocar que las especies nativas se encuentren al borde de la extinción [60]. Tomando como ejemplo a Estados Unidos, aproximadamente 50,000 especies no nativas establecidas en el país, causan pérdidas económicas que sobrepasan los 125 mil millones de dólares por año [1]. La mayoría de las introducciones de especies no nativas a gran distancia a nuevas áreas son resultado directo o indirecto de actividades humanas. Asimismo, los factores sociales y económicos son a menudo tan críticos como los factores biológicos en la introducción de especies exóticas.

Los procesos evolutivos y genéticos pueden ser factores clave para determinar si una especie invasora se establece y esparce. Las especies invasoras ofrecen una excelente oportunidad para estudiar la evolución rápida, y algunos de los ejemplos mejor documentados de dicho fenómeno han surgido de especies invasoras [61].

Las comunidades difieren en su susceptibilidad a las invasiones así como en las respuestas evolutivas y ecológicas a las mismas. Dentro de las comunidades, la invasividad es

determinada por las propiedades de las especies invasoras, las nativas y la comunidad [72]. Una especie puede ser invasora, ya sea porque comparte características con las especies nativas o porque posee atributos diferentes, de manera que puede ocupar “nichos vacíos” [63].

1.2. *P. canaliculata* en los Cultivos de Arroz

P. canaliculata se ha convertido en la mayor plaga en todos los países productores de arroz, en donde ha sido intencional y accidentalmente introducido [25]. La rápida reproducción y diseminación de esta plaga, la convierten también en una de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo [6].

Según encuestas de coyuntura oficiales del banco central del Ecuador, realizadas en importantes zonas del cultivo de arroz se conoce que entre un 75% a 100% de los productores consideran al caracol manzana la plaga más grave [7, 8].

P. canaliculata posee un apetito voraz por las plantas de agua dulce entre las que destaca el arroz. Han sido introducidos a gran escala desde América del Sur hacia varios países como un potencial alimento humano y por otras razones discutidas

posteriormente en este capítulo. El mercado fracasó, por lo que los caracoles fueron liberados o escaparon, contribuyendo con eso al establecimiento de *P. canaliculata* como plaga importante del arroz a lo largo de muchos países del sureste de Asia y actualmente al oeste de América del Sur incluyendo Ecuador. El rápido crecimiento y la reproducción de caracol manzana en sistemas de riego y campos de arroz conducen a niveles de población que pueden destruir cosechas enteras [7]. Modelos climáticos han mostrado que el molusco tiene el potencial de propagarse a muchas partes del mundo debido a su gran adaptabilidad [7]. Se suma al riesgo la capacidad de la plaga para propagarse rápidamente en las zonas agrícolas, los humedales y otros sistemas de agua dulce natural en el que puede tener un impacto grave [7].

El éxito del molusco en los arrozales se debe en gran parte al hecho de que una hembra de *P. canaliculata* en condiciones favorables, alcanza la madurez en aproximadamente 60-85 días después de la eclosión y puede reproducirse a intervalos semanales durante todo un año. Los caracoles alcanzan la superficie del agua temprano en la mañana y por la noche, dejando masas de huevos brillantes de color rosa de 25 a 500 huevos en tallos de arroz, cyperáceas, diques de los arrozales u

otros sustratos firmes. Después de 1 a 2 semanas de la deposición, las masas de huevos cambian su coloración a blanco y comienza la eclosión. El tiempo de eclosión es muy variable aunque por lo general se lleva a cabo luego de 10 a 15 días [7].

Por otro lado, las rutas de ingreso de *P. canaliculata* al Ecuador y su continua propagación hacia nuevas localidades parecen ser totalmente desconocidas. Sin embargo, se consideran las siguientes hipótesis:

Comercio de alimentos vivos: importados legal e ilegalmente para el desarrollo de proyectos de acuicultura para el consumo humano [6].

Comercio de viveros: posiblemente introducidos como huevos o caracoles juveniles de tamaño pequeño fijados a las plantas acuáticas [6].

Como mascotas en acuarios: producido como un caracol de acuario doméstico y vendido en las tiendas de mascotas [6].

Contrabando: introducidos ilegalmente, por lo general para el desarrollo como fuente de alimento humano [6].

Se dispersan por medio del agua en movimiento, como canales de riego y ríos; más recientemente, se han determinado nuevas rutas de diseminación entre las que destacan la compra-venta de plántulas de arroz para trasplante, alquiler de maquinaria para labores de fanguero y cosecha y finalmente el expendio de azolla con neonatos que son imperceptibles a simple vista. Cuando el nivel de agua cae por debajo de la altura de la concha los caracoles se movilizan a las zonas bajas y dejan de alimentarse y aparearse. Incluso pueden sobrevivir meses de sequía al excavar más profundo en el lodo y cerrando el opérculo, para emerger de nuevo después de nuevas inundaciones [7], lo que explica el fracaso del negligente plan de contingencia o “medida cuarentenaria” que anteriores responsables del sector agrícola del país recomendaron.

El daño causado por *P. canaliculata* se caracteriza por la presencia de “claros” en los campos de arroz y fragmentos de hojas flotantes [26]. Cortan la base de las plántulas con su rádula y devoran tallos y las hojas más tiernas y suculentas [27].

La magnitud de los daños de caracoles en el arroz está en función de la edad del cultivo, la densidad de caracoles y la

edad de la población de caracoles [7]. Los caracoles prefieren el tejido suave de la planta, por lo tanto un cultivo trasplantado sólo es vulnerable hasta tres semanas después del trasplante. Los caracoles son más activos en el ataque a las plantas de arroz durante la noche y al amanecer [8]. Una densidad de 3 caracoles por metro cuadrado causa pérdidas significativas de rendimiento; el caracol afecta plántulas de hasta 18-21 días cuando se siembra por trasplante y el daño es mayor cuando se realiza siembra directa [27]. Individuos de 4cm son generalmente los más destructivos independientemente del método de siembra, y causan el 100% de destrucción de plántulas en siembra directa y al menos el 20% de daño en trasplante [28].

Los últimos trabajos de investigación revelan que el número de plántulas consumidas se correlaciona positivamente con el tamaño de la concha de los caracoles. Caracoles pequeños con una altura de concha de 1 cm son demasiado pequeños para alimentarse de las plántulas de arroz, mientras que los caracoles de mayor tamaño 5cm.pueden ingerir de 7 a 24 plántulas por día [7]. Por otra parte, Boland et. al. [57], en su trabajo sobre el apetito de dos especies de *Pomacea* sobre tres especies vegetales, sugieren que los juveniles son más voraces

que los caracoles adultos en el caso particular de *P. canaliculata*. [57].

En Filipinas campos de arroz altamente infestados, la densidad llega hasta 150 caracoles por m² si se encuentran en lugares bajos [8].

1.3. Impacto Económico y Ecológico de *P. canaliculata*

Alrededor del 48% de la superficie total sembrada en Ecuador (Aprox. 414,149 hectáreas [29]) se encuentra infestada con el molusco plaga y del total producido (aprox 1706193 TM [29]) se pierde el 40% a causa de altas infestaciones, los almácigos infestados son consumidos en un 80 y 100% según explican los productores locales; todo lo expuesto, se traduce en grandes pérdidas económicas.

El problema se agrava debido a que para el control, los productores aplican dosis altas de insecticidas organoclorados (Endosulfán + Methomyl) provocando resistencia de plagas tradicionales del cultivo, eliminación de organismos benéficos y el resurgimiento de problemas fitosanitarios [8]. La utilización de pesticidas organoclorados para controlar las poblaciones de

caracoles resulta en el exterminio de los peces que habitan en la cercanía de los arrozales, además de constituir un riesgo para la salud humana, debido a la toxicidad de los productos empleados [8].

La introducción de *P. canaliculata* implica la disminución de las especies nativas de caracol en su competencia por alimento. Además, las especies nativas se han reducido como consecuencia de la aplicación de pesticidas contra las poblaciones de caracoles [7]. *P. canaliculata* ya ha sido introducido a los EE.UU. y amenaza a los principales cultivos de arroz de Texas y California; en Australia, en particular, están muy preocupados acerca de su posible introducción en los humedales naturales así como a las zonas arroceras [6].

Sobre el endosulfán –ampliamente usado para el control de los caracoles-, se han encontrado residuos en aire, lluvia, nieve, neblina, lagos, ríos, sedimentos de río, agua subterránea, agua de pozo, agua de manantial, agua municipal, agua de mar y sedimento marino, estanques de camarón, lagunas, sedimentos de estuarios, suelo, corteza de árbol, plantas acuáticas, peces, huevos de cocodrilo y de otra biota [11]. Expertos en biotecnología han mostrado su preocupación por lo que está pasando en los senderos y ríos de las zonas arroceras. Las

personas que viven en estos sectores se alimentan de peces con pesticidas y consumen algunos alimentos que contienen residuos químicos [8].

Por otra parte, según estudios científicos es un carcinógeno potencial en humanos, genotóxico a bacterias, a células humanas y a células de ratones, promotor de tumores, y mutagénico, potencial disruptor endocrino en especies acuáticas y terrestres, es estrogénico y un antagonista androgénico [11]. Ocasiona bajo coeficiente intelectual y otros problemas de aprendizaje en población infantil, serias anomalías congénitas con malformaciones, problemas neurológicos y anomalías del sistema reproductivo (NIOH 2002) [11]. El *endosulfán* se bioacumula en alimentos y es lipofílico, se puede disolver en grasas y se biomagnifica en las cadenas alimenticias. Se han encontrado residuos de endosulfán en alimentos en diversas partes del mundo [11].

Adicionalmente, *P. canaliculata* representa una seria amenaza para humedales de todo el mundo a través de posibles modificaciones del hábitat y la competencia con especies nativas [6] lo que puede tener un impacto grave. Estos impactos potenciales podrían implicar la destrucción de la vegetación acuática local que conduce a graves modificaciones del hábitat,

así como las interacciones competitivas con la fauna acuática nativa, incluyendo caracoles nativos [7].

1.4. Situación Actual de *P. canaliculata* en el Ecuador.

Daños directos o indirectos ocasionados por caracol manzana en los cultivos de arroz han sido reportados en cantones de la provincia del Guayas como: Daule, Santa Lucía, Balzar, Samborondón y Naranjal [9]. El problema se extiende a Ricaurte, Babahoyo, Vinces, Quevedo y otras localidades de la provincia de los Ríos [Paredes 2012, comunicación personal]. Ver mapa de distribución (Figura 1.1)

La creciente importancia económica que tienen las pérdidas ocasionadas por el caracol manzana ha preocupado a los productores y técnicos responsables pertenecientes a instituciones gubernamentales, que ya han mostrado su gran preocupación por la plaga que perjudica al cultivo actualmente y aseguran que para el año 2011 la producción por hectárea del cultivo de arroz, disminuyó en un 40% a causa del molusco plaga y el virus de la hoja blanca transmitido por el Delphácido *Tagozodes orizicolus* [9].

El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), a través de la Agencia Ecuatoriana de

AGROCALIDAD y el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) han propuesto medidas culturales para el control de *P. canaliculata*. Sin embargo, los problemas en el cultivo persisten [9].

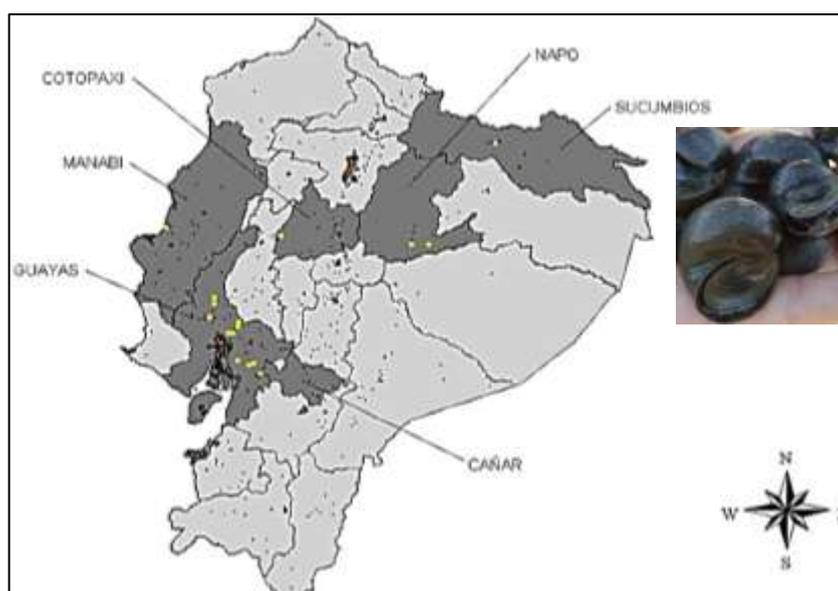


FIGURA 1.1 DISTRIBUCIÓN DE *POMACEA CANALICULATA* EN EL ECUADOR, FUENTE: AGROCALIDAD, 2011

Gran parte de asociaciones de productores se han organizado con la finalidad de solicitar soluciones a los organismos gubernamentales, tal es el caso de la Asociación de Arroceros del Plan América Lomas, en Daule, quienes manifestaron que la productividad ha bajado en un 35% y 40%, en la zona que era muy rentable, cuyo índice de producción bajó de 5 y 6 toneladas por hectárea a 3 [9].

En Santa Lucía los daños ocasionados por *P. canaliculata* y cinta blanca, mantienen en alarma a los socios de la junta que agrupa a 600 pequeños agricultores y cuenta con 1.200 hectáreas de cultivos de arroz. [9].

Por otra parte, en Naranjal la situación de los agricultores es trágica, en las piscinas de arroz, se evidencia el destrozo que ha ocasionado el caracol manzana, que por millares ha invadido sus tierras y los canales de riego. Los productores analizan la posibilidad de dejar de sembrar la gramínea durante varios meses y optar por otros alimentos que no sean afectados debido a que los costos de producción han sufrido un incremento estimado en 500 hasta 800 dólares por hectárea. En contraste, los productores en esta localidad indican que el uso indiscriminado de agroquímicos, utilizados para eliminar las plagas posee un efecto adverso sobre varias especies de peces como la viejita (*Aequidens rivulatus*), el barbudo (*Rhamdia cinerascens*), tilapia (*Sarotherodon sp.*), guanchiche (*Hoplias microlepis*), dica (*Curimatorbis bulengeri*), de consumo común y tradicional, y sobre el pájaro caracolero (*Rostrhamus sociabilis*), cuya abundancia relativa se ha reducido de forma alarmante al alimentarse de caracoles envenenados [9].

1.5. Estrategias de Control

Lo siguiente es una compilación de los autores sobre las principales estrategias de control empleadas alrededor del mundo para la supresión de *P. canaliculata*.

1.5.1 Control Químico

La mayor parte de agricultores utilizan pesticidas organoclorados de amplio espectro, altamente tóxicos para el control de poblaciones de caracoles, rociando el producto inmediatamente después del trasplante de sus cultivos [8].

A nivel mundial se ha tolerado el uso de estos plaguicidas por algún tiempo, sin embargo diversos estudios científicos han mostrado que los productos químicos ocasionan graves daños a la salud humana y al medio ambiente [8]. Los productos utilizados son: Endosulfán, Methomyl y sus combinaciones.



FIGURA 1.2 A) PRESENTACIÓN COMERCIAL DEL ENDOSULFÁN, COMÚNMENTE USADO PARA EL CONTROL DE *P. CANALICULATA*. B) PARCELA TRATADA CON ENDOSULFÁN, LA FLECHA ROJA SEÑALA UN ANFIBIO MUERTO A CAUSA DEL AGRO TÓXICO.

Los arroceros reportan el mal uso de agroquímicos para eliminar al caracol manzana, al elevar la dosis de 0,5 L de endosulfán/tanque de 200 L de agua a 2 L [9].

1.5.2 Control Cultural

Algunos autores recomiendan realizar prácticas culturales durante la preparación del terreno como: retirar los caracoles del arrozal antes de la última rastrillada. El momento propicio para hacerlo es al amanecer o al atardecer porque es cuando son más activos y es fácil encontrarlos. Así mismo, es ampliamente conocida la recomendación del uso de plantas tóxicas para los caracoles, como por ejemplo: corteza de gugo (*Entada phaseikaudes*), hojas de piñón de

Indias (*Croton tiglium*), hojas de sambong (*Blumea balsamifera*), hojas de tuatúa (*Jatropha gossypifolia*), hojas de gabihan (*Monochoria vaginalis*), hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L), hojas de calamansi (*Citrus microcarpa* Bunge), hojas de makabuhay (*Tinospora rumphii* Boerl), fruto de la pimienta roja, hojas de algodón de seda (*Calatropis gigantea*), hojas de neem (*Azadirachta indica*) [12]. Los autores desconocen la efectividad de tales alternativas de control, puesto que la actividad molusquicida de dichas especies vegetales sobre *P. canaliculata* no ha sido demostrada científicamente.

En países con invasiones de moluscos, es común que los agricultores construyan zanjas profundas en los lotes para acumular a los caracoles (25 cm de ancho por 5 cm de profundidad), arrastrando un saco o costal con un objeto pesado en su interior. Estas zanjas deben estar separadas entre sí por una distancia de 10-15 m. Así mismo, hacer pequeños canales (25 cm de ancho por 5 cm de profundidad) al borde del arrozal. Además, se colocan cercas de alambre o bambú en la entrada y salida del canal principal de irrigación; esto evitará la llegada de caracoles recién eclosionados y adultos y facilitará su recolección.

Siguiendo las recomendaciones de Joshi et.al. [59] en su manual para el manejo de *P. canaliculata*, se recomiendan algunas acciones durante el trasplante de las plántulas de arroz: Si el caracol es un problema grave, se debe trasplantar las plántulas de 25-30 días. Colocar estacas de bambú sobre áreas del terreno inundadas o cerca de los canales de irrigación con el fin de atraer los adultos para la postura de huevos. Esto facilitará su recolección y trituración. Drenar ocasionalmente los terrenos para limitar así la diseminación de caracoles y sus periodos de alimentación (riego intermitente). Utilizar variedades de arroz que sean menos apetecidas por los caracoles. El mismo manual para el manejo de caracoles en Filipinas, sugiere ciertas medidas a tomar después de la cosecha como la liberación de patos inmediatamente después cosechado el arroz o en la última rastrillada, requerida para el siguiente cultivo. Se puede realizar de nuevo esta actividad a los 30-35 días después del trasplante.

TABLA 1. MANEJO INTEGRADO DE POMACEA CANALICULATA EN DIFERENTES ETAPAS DEL CULTIVO DE ARROZ

Antes de la siembra	Siembra			Postcosecha
Preparación del terreno	Vegetativa	Reproductiva	Madurez fisiológica	Después de la cosecha
A	B y C		D	E

A= Pastura de patos, recolección manual de adultos, construcción de canales, uso de plantas tóxicas y destrucción de huevos.

B = Recolección manual de adultos, pastura de patos, trampa para atrapar y destruir huevos.

C = Nivel del agua, recolección manual de adultos, uso de plantas tóxicas y destrucción de huevos.

D=Recolección de adultos y destrucción de masas de huevos

E=Pastura de patos y preparación del terreno

TABLA 2. ACTIVIDADES DE LOS AGRICULTORES: ACTIVIDADES, POSIBLES OPCIONES, SUS EFECTOS Y POSIBLE ACEPTACIÓN DE LOS AGRICULTORES

ACTIVIDADES DE GRANJA	IMPLICACIONES EN EL MANEJO	POSIBLES EFECTOS	POSIBILADES DE ACEPTACION EN GRANJA
Absorción del suelo	Crianza de patos	Comida picante para patos	Alta variabilidad
	Colección manual	Mano de obra intensiva	Extremadamente alta
	Labrado	Labores intensivas	Practicas anteriores
Preparación del suelo	Colección manual	Labores intensivas	Extremadamente alta
	Instalación de mallas en entradas de agua	Labores costosas no efectivas	Baja
Manejo de plagas de los cultivos	Recolección manual	Labores intensivas	Extremadamente alta
	Aplicación de agroquímicos	Fatal para otros organismos	Alta
	Manejo adecuado del agua	Labores intensivas	Extremadamente alta
Cosecha	Colección manual	Labores intensivas	Extremadamente alta
Después de cosecha	Arado profundo	Aumento de la mortalidad	Extremadamente alta

1.5.3 Control Biológico

Pomacea es más propensa a ser presa de los peces a causa de que su caparazón es más fino y suave en comparación con otros caracoles en la comunidad de moluscos, tales como *Brotia*, *Thiara* y *Bitinia*, que tienen conchas más duras con nódulos y protuberancias [13]. El uso de peces como control biológico de moluscos en Israel y África está bien documentado. Los ensayos de campo sobre el uso de la carpa común (*Cyprinus carpio*), la tilapia del nilo (*Oreochromis niloticus*), la carpa negra (*Mylopharyngodon piceus*) y el pez gato híbrido (*Clarias gariepinus*) para el control de *Pomacea* ha sido llevado a cabo en las Filipinas y Vietnam, con resultados alentadores. La carpa común y la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) han sido experimentalmente utilizados para controlar *Pomacea* en campos de arroz en las Filipinas. En este estudio se encontró que la carpa común era un eficaz depredador del caracol manzana [31].

La selección de los peces autóctonos es importante en el biocontrol de caracoles. Por ejemplo, aunque la mayoría de caracoles en África eran controlados por *Hapochromis melandi* y *Tilapia melanopleura*, estos peces no son

ampliamente distribuidos fuera de su área endémica y antes de hacer la transferencia se deben hacer estudios de impacto ambiental sobre la introducción y liberación en hábitats exóticos como las Islas galápagos en el Ecuador [13].

Controlar moluscos acuáticos empleando peces no es un nuevo concepto. *Physopsis* y *Biomphalaria*, comunes en África Central han sido controlados abasteciendo un estanque con peces de la especie *Senrranochromis sp* [32]. Así, el uso de peces como un agente de control biológico para *Pomacea* es bastante factible [13].

Dentro de la clase Insecta, el saltamontes de cuernos largos (*Conocephalous longipennis*), puede reducir la población de *P. canaliculata*, al alimentarse de los huevos. En un trabajo de campo, investigadores observaron el número de masas de huevos devoradas y con cáscaras rotas o trizadas. Para determinar la causa de los daños a la masas de huevos, Joshi et al. [14] muestrearon los posibles depredadores en arroz y en hábitats sin arroz.

P. canaliculata pone sus huevos sobre tallos de plantas o en muros cercanos al agua, los huevos se enfrentan a

diferentes formas de depredación. Independientemente del color llamativo rojo de los huevos, muy pocos animales los consumen probablemente porque tienen sabor desagradable [50].

Ha sido observada la depredación de huevos de *P. canaliculata* por *Solenopsis geminata* en Filipinas y en Tailandia.

S. geminata es autóctona de la zona sur de América del Norte y América Central. Se introdujo involuntariamente en muchas áreas tropicales y subtropicales. Adicionalmente, algunas hormigas del género *Pheidologeton* también han sido reportadas como depredadoras de huevos de *P. canaliculata* [15].

1.6 Extractos con Actividad Molusquicida

Consciente de los riesgos de toxicidad de los molusquicidas sintéticos, la comunidad científica han llevado a cabo trabajos para utilizar las propiedades naturales del reino de las plantas con el fin de resolver el problema de *P. canaliculata*.

Blumea balsamifera, *Jatropha menispermum*, *Nicotiana tabacum*, *Derris philippinensis*, *Tinospora rumphii* y *Capsicum*

frutescens son plantas tóxicas para los caracoles (70 - 100% de mortalidad)[48]. Maini y Rejesus evaluaron 53 plantas más [41]. Entre estas, *Derris elliptica* (tubli) resultó altamente tóxica para los caracoles y fue elegida para ser investigada con más detalle debido a su amplia presencia a lo largo de los arroyos y en los bosques secundarios en altitud baja y media [42]. Además, el Neem (*Azadirachta indica*), ha sido objeto de estudio científico como una fuente de productos naturales para el manejo integrado de plagas; Schmutter revisó la eficacia de diferentes derivados de neem contra los moluscos[43]. Muley señaló que la mortalidad del 100% del caracol *Melania scabra* se produjo en 20 minutos cuando se tratan con extracto al 0,5% de polvo seco de semillas de neem. Extractos de la semilla de neem resultó igualmente tóxico contra *Biomphalaria glabrata*[44]. Las especies de moluscos *Lymnaea luteola* y *Gyraulus convexiusculus* fueron tratadas con hojas secas, alcanzando la mortalidad en 24 horas. Las hojas, corteza y frutos también fueron probados en contra otros moluscos consiguiendo resultados exitosos. Maini y Rejesus [44] probaron extractos acuosos de hojas, semillas de neem, y aceite de neem contra *P.canaliculata*, los extractos de semillas y hojas fueron los más tóxicos causando el 100% de mortalidad a 100ppm después de

48 horas. Los efectos de los tratamientos en base de neem sobre la ecología de los caracoles todavía están siendo investigados. El extracto acuoso de semillas de neem fue probado contra caracoles de agua dulce con y sin opérculo [44].

Vulgarone-B es otro molusquicida vegetal aislado del aceite destilado [45] de la *Artemisia douglasiana* Besser. El estudio de Joshi et al. (2005) ha señalado que el Vulgarone-B tiene actividad molusquicida comparable a la del metaldehído (molusquicida comercial) en un bioensayo de laboratorio que indica 100% mortalidad de caracoles en 24 horas [46].

Otra especie con propiedades molusquicidas es *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng (Lecythidaceae) es una planta tropical, ampliamente distribuida en el este de África, sureste de Asia e islas del Pacífico y crece en lugares donde se expone a intensidades altas de luz solar por largos periodos. Sus frutos son utilizados como medicina tradicional para algunas enfermedades. La semilla de esta planta contiene saponinas y flavonoides [47]. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la planta y muestran un amplio rango de propiedades biológicas [48]. Han sido llevados a cabo algunos estudios sobre la actividad citotóxica de *B. racemosa* sobre *P.*

canaliculata. La aplicación del extracto mostro un efecto significativo en la tasa de mortalidad de los caracoles [49].

1.7 Los Artrópodos como Indicadores de Impacto Ecológico.

Biodiversidad o diversidad biológica es el número total de especies de animales, plantas y microorganismos encontrados en un área determinada [17].

La diversidad biológica del Ecuador posee un alto valor debido a factores como como la riqueza de especies, el alto grado de endemidad, la particularidad de los procesos ecológicos y por su estado de conservación [16].

Los insectos representan los componentes más numerosos de los ecosistemas terrestres, tanto en número de especies como de individuos; están distribuidos en todos los hábitats del mundo y constituyen el grupo de organismos más diversos, ya que de cada diez seres vivos, más de cinco son insectos y de cada diez animales al menos siete lo son[33, 34]; la importancia de los artrópodos radica en los roles que estos cumplen dentro de los hábitats para su sobrevivencia, ellos son fundamentales para la polinización de alrededor del 80% de especies vegetales [35,36], para el control de plagas y malezas y son fuente importante para la alimentación de otros animales (incluso para

el hombre). Muchos insectos tienen importancia industrial, medicinal, forense y artística, además de ser útiles en la investigación científica y la enseñanza [37]. El estudio de estos grupos taxonómicos se torna clave en el ámbito ecológico, debido a que, los insectos con su presencia o ausencia pueden mostrar el estado de la biota referente a parámetros como biodiversidad y biogeografía o grado de intervención humana [38, 39].

Bioindicadores son especies que tienen rangos estrechos de amplitud con respecto a uno o más factores ambientales, y su presencia indica una condición particular o un conjunto de condiciones ambientales. El monitoreo de impacto ambiental mediante el uso de bioindicadores se ha propuesto ya que no es posible y/o práctico evaluar la respuesta individual de cada uno de los componentes de un sistema a las diferentes condiciones del ambiente. En este sentido, se debe asumir que las respuestas de los indicadores reflejan las respuestas de muchos de los otros miembros del ensamblaje estudiado y que son una parte importante de la integridad ecológica de los hábitats [18].

Numerosos autores han listado criterios a priori para la selección de grupos potencialmente efectivos de taxa indicadores y muchos estudios han aplicado esto para justificar la conveniencia de grupos particulares como indicadores [19].

Estos criterios probablemente han servido más para descartar que para escoger las especies o grupos que sean candidatos para indicadores. La bioindicación y la variedad de términos usados con relación al concepto, pueden ser repartidos en tres categorías correspondientes a las tres principales aplicaciones de bioindicadores según McGeoch [20].

TABLA 3. FUNCIONES DE LOS GRUPOS EN CADA CATEGORÍA DE BIOINDICACIÓN

Categoría del indicador	Funciones alternativas
Ambiental	Detecta un cambio en el estado del ambiente
	Monitorea cambios en el estado del ambiente
Ecológica	Demuestra el impacto de un factor de estrés sobre la biota
	Monitorea durante largo tiempo cambios inducidos por factores de estrés en la biota
Biodiversidad	Identifica la diversidad de taxa en un área específica
	Monitorea cambios en la biodiversidad

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Recolección y Procesamiento del Material Vegetal.

La búsqueda de material vegetal se caracterizó por la poca disponibilidad de las plantas estudiadas en las localidades planificadas al inicio de la experimentación. Factores como: la escasez de lluvias, expansión de fincas y/o extensión de cultivos han permitido la desaparición de zonas en las que las plantas bajo experimentación crecían de manera silvestre.

El material vegetal empleado para la elaboración de los extractos evaluados en esta investigación, fue recolectado en dos localidades de la provincia del Guayas; los frutos de CBE-PAT-FP-001 se colectaron en la hacienda “*Yolanda*” ubicada en el recinto La Unión, en el Km 12 de la vía Naranjito-Bucay. Por

otro lado, el material vegetal de *CBE-PAT-FP-002* se recolectó en el vivero de plantas ornamentales -“*D’ Lirios*”-, ubicado en el Km 3.5 de la vía Milagro – Naranjito del cantón Milagro, Provincia del Guayas. En la misma localidad se lograron obtener algunos frutos de *CBE-PAT-FP-001*.

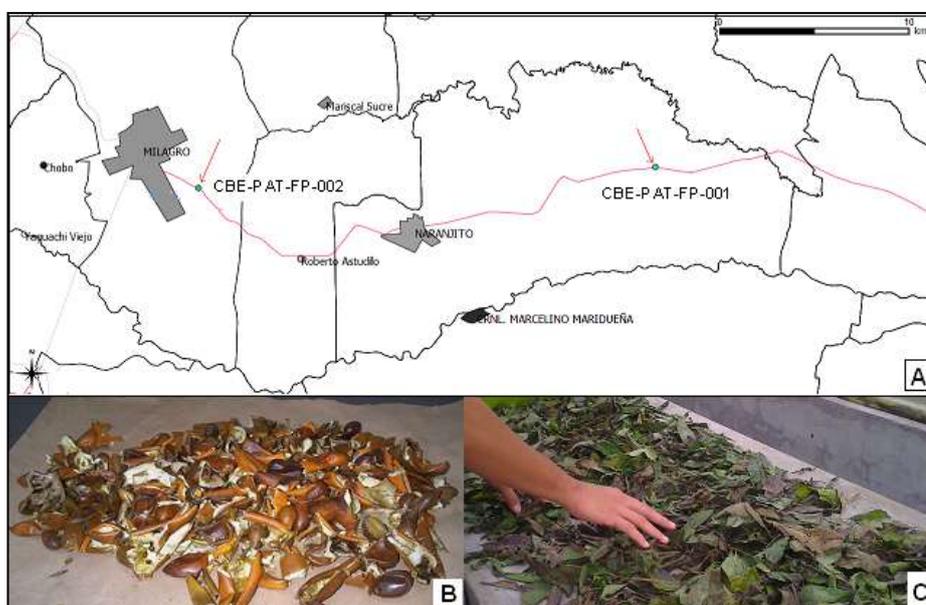


FIGURA. 2.1 (A) DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS ZONAS DE RECOLECCIÓN EN LA PROVINCIA DE GUAYAS, LAS FLECHAS INDICAN LAS ZONAS DE COLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.(B) MATERIAL VEGETAL SECO DE CBE-PAT-FP-001. (C) MATERIAL VEGETAL SECO CBE-PAT-FP-002.

De *CBE-PAT-FP-001* se utilizaron los frutos, los mismos que fueron cortados en partes más pequeñas con la finalidad de facilitar el proceso de secado (Figura 2.2 A).

El material cortado fue colocado en láminas de papel kraft dentro de una estufa a temperatura de 120°C durante 48 horas para eliminar todo el contenido de agua de los frutos (Figura 2.2 B).



FIGURA. 2.2 (A) CORTE DE FRUTOS DE CBE-PAT-FP-001.(B) MATERIAL COLOCADO EN LA ESTUFA LISTO PARA EL PROCESO DE SECADO. (C) FRUTOS DESPUÉS DEL SECADO. (D) PROCESO DE MOLIDO DEL MATERIAL SECO.

Luego del secado de los frutos de CBE-PAT-FP-001, todo el material fue desintegrado en un molino de acción manual (CORONA), se repitió el proceso hasta obtener partículas inferiores a $\approx 2\text{mm}$ de grosor, el polvo obtenido de la

pulverización, fue el empleado en la elaboración del extracto acuoso. En el proceso, es indispensable el empleo de mascarilla debido a que las partículas obtenidas pueden ocasionar irritación de la mucosa nasal.

Para la elaboración del extracto en base a CBE-PAT-FP-002, se emplearon únicamente hojas, esto, debido a la abundancia de folíolos al momento de la colección de las plantas y a la facilidad para procesarlas. Además, la escasa inflorescencia de las plantas, no permitió la obtención de una cantidad apropiada de flores para la elaboración de los extractos.

Las hojas de CBE-PAT-FP-002 fueron colocadas en mesones expuestas al sol a temperatura ambiente durante un lapso de 72 horas. Las hojas secas se trituraron manualmente obteniendo fragmentos de 1 a 3 mm aproximadamente.



FIGURA. 2.3 (A) MATERIAL VEGETAL DE CBE-PAT-FP-002 COLOCADO A TEMPERATURA AMBIENTE. (B) MATERIAL VEGETAL SECO. (C) TRITURADO DE MATERIAL VEGETAL SECO. (D) RESULTADOS DEL PROCESO MANUAL DE TRITURACIÓN.

2.2. Elaboración de Extractos.

En la elaboración de los extractos se utilizó el material vegetal previamente pulverizado / triturado de cada especie vegetal por separado.

Para la obtención del extracto acuoso de *CBE-PAT-FP-001* [51], se colocaron 5 litros de agua destilada en un recipiente metálico sometido a cocción hasta alcanzar el punto de ebullición, se agregaron 500 gramos del material pulverizado y se continúa la cocción durante 20 minutos. Posteriormente la mezcla fue filtrada, y el extracto obtenido fue envasado en botellas plásticas y almacenadas en un lugar oscuro para evitar cualquier alteración a causa de la luz, además se midieron los parámetros fisicoquímicos (pH, C.E).

Se repitió el procedimiento para preparar la cantidad deseada de extracto concentrado a 100.000 ppm.



FIGURA. 2.4 (A) MATERIAL VEGETAL PULVERIZADO. (B) PROCESO DE COCCIÓN. (C) MEZCLA RESULTADO DE LA COCCIÓN. (D) FILTRADO DE LA MEZCLA. (E) EXTRACTO DE *SOLANUM MAMMOSUN*. (F) ENVASADO DEL EXTRACTO.

Para la obtención del extracto alcohólico de *CBE-PAT-FP-002*[51], el material seco y triturado fue colocado en recipientes con alcohol etílico al 80% y colocado durante un

periodo de 48 horas en la zaranda (*C10 Plataform Shaker*) para su homogenización.



FIGURA. 2.5 (A) MATERIAL VEGETAL TRITURADO (CBE-PAT-FP-002). (B) COLOCACIÓN DEL MATERIAL EN LOS RECIPIENTES. (C) FRASCOS CON LA MEZCLA (TRITURADO/ALCOHOL ETÍLICO AL 80%). (D) PROCESO DE HOMOGENIZACIÓN DE LA MEZCLA.

La cantidad de material triturado empleado fue 300 gr en 2000 ml de alcohol obteniendo un concentrado a 150000 mgL^{-1} . Posteriormente la mezcla fue filtrada ($0,22 \mu\text{m}$) y colocada en vasos de precipitación, el líquido obtenido se llevó al rotoevaporador para la eliminación del solvente.

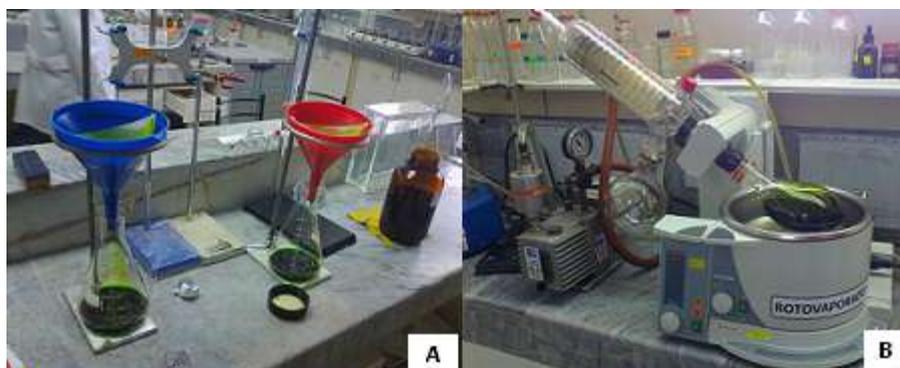


FIGURA. 2.6 (A) FILTRADO DE LA MEZCLA HOMOGENIZADA. (B) ELIMINACIÓN DEL SOLVENTE EN EL ROTOEVAPORADOR.

2.3. Bioensayos en Laboratorio.

El bioensayo fue llevado a cabo en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de la Ecuador (C.I.B.E.) ubicado en el Campus Gustavo Galindo. Los especímenes de *P. canaliculata*, se colectaron en canales de riego de campos de arroz [54] en sector Plan América, Cantón Daule Provincia del Guayas.



FIGURA. 2.7 RECOLECCIÓN DE CARACOLES (POMACEA CANALICULATA)

Alrededor de 600 caracoles fueron colocados en tanques de plástico con agua del canal para su traslado inmediato hasta el laboratorio del CIBE. Se lavaron los especímenes con agua destilada y se colocaron en peceras (50x30x50cm) de capacidad de 75L de volumen durante un periodo de 48 horas para el periodo de adaptación [54], la dieta empleada para el mantenimiento de los individuos fue en base de hojas de *Cucurbita sp.* siguiendo las recomendaciones de estudios preliminares realizados en el CIBE.



FIGURA. 2.8 (A) RECOLECCIÓN DE CARACOLES (*POMACEA CANALICULATA*). (B) ESPECÍMENES EN TANQUE DE PLÁSTICO. (C) LAVADO DE CARACOLES. (D) PECERA CON ESPECÍMENES.

La metodología empleada en los bioensayos para determinar la actividad molusquicida de los extractos vegetales, es la descrita en el protocolo CBE-PROT-FP-15, que sigue los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud [52].

En total se evaluaron cinco concentraciones de cada extracto vegetal (150, 250, 500, 750, 1000 ppm), el experimento se replicó cuatro veces.

Para determinar la bioactividad, se emplearon viales de polietileno de dos litros de capacidad, en cada vial se colocaron diez moluscos. Las concentraciones fueron diluidas en un litro de agua destilada por vial. Los tratamientos fueron comparados con un testigo positivo en el que se utilizó Endosulfán y un testigo negativo que consistió en agua destilada.



FIGURA. 2.9 (A) VIALES DE POLIETILENO USADOS PARA EL BIOENSAYO EN EL LABORATORIO. (B) COLOCACIÓN DE DIEZ CARACOLAS POR VIAL. (C) BIOENSAYO EN EL LABORATORIO, VIALES CON LAS DILUCIONES DE EXTRACTOS (D) EXTRACTO DILUIDO EN EL VIAL CON LOS CARACOLAS (*POMÁCEA CANALICULATA*).

La mortalidad fue evaluada después de 24 horas de exposición, posteriormente, los individuos muertos fueron descartados y los sobrevivientes colocados en viales de polietileno con un litro de agua destilada para el periodo de recuperación. La lectura de mortalidad de los sobrevivientes fue evaluada después de 24 horas de exposición al agua destilada.

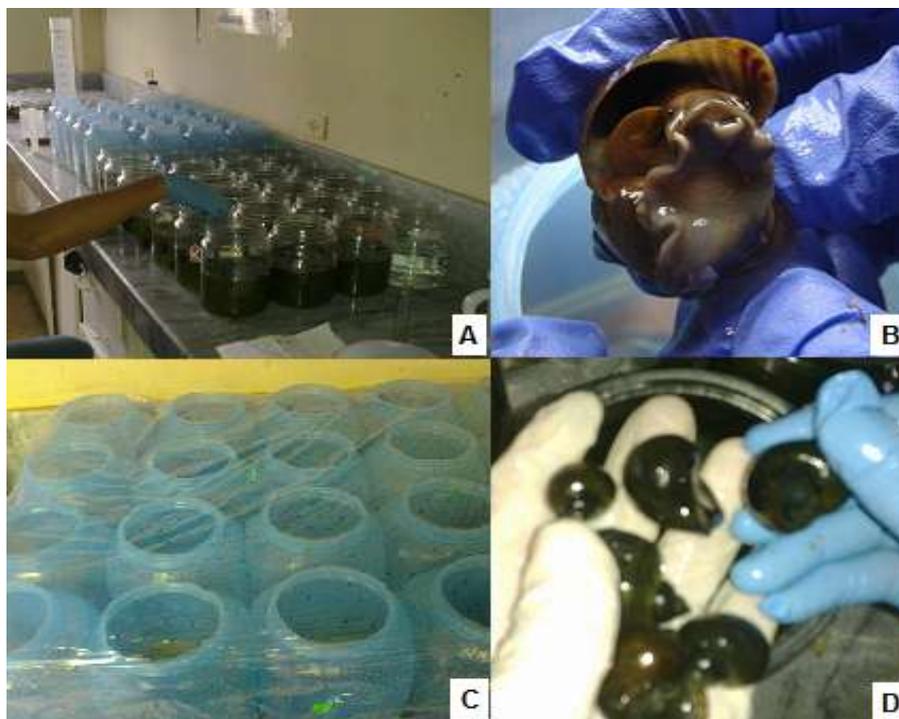


FIGURA. 2.10 (A) EVALUACIÓN DEL BIOENSAYO EN EL LABORATORIO. (B) CARACOLAS MUERTOS DESCARTADOS. (C) ESPECÍMENES (*POMACEA CANALICULATA*) COLOCADOS EN AGUA DESTILADA. (D) ESPECÍMENES SOBREVIVIENTES DESPUÉS DE LA SEGUNDA EVALUACIÓN.

La dosis letal media fue obtenida mediante el paquete estadístico Kyplot (Versión 2.0 beta 13) disponible en la web. Las medias de los diferentes tratamientos fueron comparadas mediante un Análisis de la varianza; Se emplearon las mismas concentraciones en los ensayos de campo.

2.4 Bioensayos en Campo.

Las unidades experimentales del bioensayo en campo fueron instaladas en terrenos de arroz infestados con *P. canaliculata*, ubicados en el sector Plan América – Lomas, Cantón Daule, provincia del Guayas.

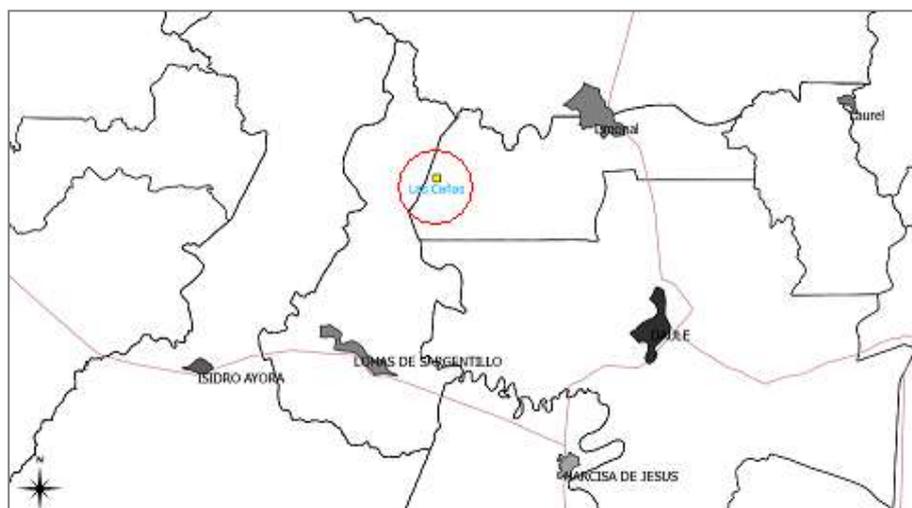


FIGURA. 2.11 UBICACIÓN DEL BIOENSAYO EN CAMPO

Se usó un diseño de bloques completos al azar D.B.C.A. para evaluar el efecto de los extractos se compararon doce tratamientos: cinco tratamientos en base al extracto de CBE-PAT-FP-001, cinco tratamientos en base al extracto de CBE-PAT-FP-002, un testigo positivo con Endosulfán y un testigo

solo con agua destilada. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento, siguiendo la metodología empleada por Matthew et al. [53]. Los bloques se separaron mediante la elaboración de piscinas de 4 m².

TABLA 4. TRATAMIENTOS EVALUADOS EN EL BIOENSAYO EN CAMPO.

Diseño de Bloques Completos al Azar (D.B.C.A.)		
Tratamiento	Dosis (ppm)	Extracto
T1A	150	<i>CBE-PAT-FP-001</i>
T2A	250	<i>CBE-PAT-FP-001</i>
T3A	500	<i>CBE-PAT-FP-001</i>
T4A	750	<i>CBE-PAT-FP-001</i>
T5A	1000	<i>CBE-PAT-FP-001</i>
T6B	150	<i>CBE-PAT-FP-002</i>
T7B	250	<i>CBE-PAT-FP-002</i>
T8B	500	<i>CBE-PAT-FP-002</i>
T9B	750	<i>CBE-PAT-FP-002</i>
T10B	1000	<i>CBE-PAT-FP-002</i>
T11 Testigo-Positivo	Sugerida en etiqueta	Endosulfán
T12 Testigo-Negativo	-	-

Para el ensayo de campo se preparó el terreno de la siguiente manera:

Luego del paso de la fanguadora se elaboraron pequeños muros para dividir el terreno en 48 parcelas de 2x2m distribuidas en 4 columnas de 12 parcelas cada una.

En las esquinas de las parcelas se colocaron trampas utilizando tarrinas plásticas llenas de cerveza como cebo para extraer la mayor cantidad de caracoles posibles y dejar las parcelas libres de los mismos.

Se retiraron las tarrinas 24 horas después, logrando sacar de 5 a 11 caracoles por parcela aproximadamente.

Se sembró el arroz por trasplante procurando dejar en cada parcela un total de 56 plantas, para luego evaluar el porcentaje de daño cuantificando la cantidad de plantas afectadas/devoradas por los caracoles.



FIGURA. 2.12 (A) LEVANTAMIENTO DE LOS MUROS. (B) CONSTRUCCIÓN DE PARCELAS. (C) PARCELA DE 2MX2M. (D) SIEMBRA DEL ARROZ CON EL MÉTODO DE TRASPLANTE

Una vez preparado el terreno se infestaron las parcelas artificialmente con tres caracoles por metro cuadrado, una densidad que resulta en daños significativos. Se colectaron aproximadamente 600 caracoles empleando individuos de 3 a 5cm de longitud aproximadamente y se procedió a aplicar los extractos en concentraciones de 150, 250, 500, 750, 1000 ppm además del Endosulfán (dosis recomendada en la etiqueta) y el testigo sin aplicar ningún producto.

TABLA 5. DISTRIBUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN EL ÁREA DEL EXPERIMENTO

Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4
T12	T5	T3	T5
T4	T10	T4	T2
T11	T1	T9	T10
T6	T4	T7	T12
T7	T6	T8	T4
T3	T11	T12	T7
T8	T9	T2	T8
T10	T8	T5	T1
T9	T2	T6	T9
T2	T7	T1	T6
T5	T12	T10	T11
T1	T3	T11	T3

Se emplearon dos bombas manuales (CP3) de 4 litros, y las diluciones se hicieron en el laboratorio en 2 litros de agua destilada. Se evaluaron los tratamientos luego de 24 horas de la aplicación y se siguió evaluando continuamente durante 5 días.



FIGURA. 2.13 (A) ÁREA DEL ENSAYO SEMBRADA. (B) INFESTACIÓN DE PARCELAS CON CARACOLES (*POMÁCEA CANALICULATA*). (C) EXTRACTOS Y BOMBAS PARA LA APLICACIÓN. (D) APLICACIÓN DE LOS EXTRACTOS SEGÚN LA DOSIS POR TRATAMIENTO. (E) EVALUACIÓN DEL DAÑO EN LAS PARCELAS. (F) DAÑO CAUSADO POR EL CARACOL MANZANA (*POMÁCEA CANALICULATA*)

No se infestaron áreas libres de *P. canaliculata*, más bien, se trasladaron los caracoles de canales y pozas hacia al área donde se realizó el experimento. El daño del caracol manzana a las plántulas, se midió de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de daño} = \frac{\# \text{ de plantulas consumidas por cuadrantes}}{\# \text{ de plantulas}} \times 100$$

Se registró la tasa de mortalidad y se determinó la DL50 con el programa estadístico Kyplot (Versión 2.0 beta 13) disponible en la web.

2.4. Medición de la Diversidad de Artrópodos.

Para efectos de estudiar la entomofauna existente en la zona donde se realizó el ensayo, se evaluaron las 48 parcelas en las que se dividió el área del experimento.

La captura de los insectos se realizó mediante el método de colecta directa que consiste en la búsqueda dirigida de los individuos presentes en cada parcela de cuatro metros cuadrados. Además, se procedió al abatimiento de la vegetación mediante el uso de redes entomológicas. Se efectuaron dos pases de red por unidad experimental y los

individuos colectados se conservaron en viales con alcohol al 70% [8] para su identificación en los laboratorios, cada vial fue rotulado de acuerdo al tratamiento y repetición evaluada.

La identificación taxonómica de los insectos se realizó hasta el nivel de familias y subfamilias por comparación de características morfológicas, mediante el uso de claves taxonómicas, se emplearon: "An introduction to the study of insects", "A Handbook of the Families of Neatic Chalcidoidea (Hymenoptera)", "How to Know aquatic insects", "Ordenes y Familias de Insectos de Centroamérica" y "Parasitoides de plagas agrícolas en América Central" ; para la identificación de insectos inmaduros se empleó " How to know the Mites and Ticks", "How to Know the Immature insects", "Estados inmaduros de los insectos", "Identificación taxonómica de insectos inmaduros y órdenes menores". Además se emplearon colecciones sinópticas disponibles en la web como: Coccinellidae del Perú, Colección sinóptica del Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica (INBIO), Díptera Collection, e Identificación, imágenes e información de insectos y arañas de Estados Unidos y Canadá (BUGGUIDE). Para la manipulación de los especímenes se emplearon pinzas de disección (5-INOX) y la observación de las características

morfológicas se realizó mediante microscopios estéreo de 4,5 X de aumento.

Para la medición de la biodiversidad se empleó el índice de Margalef que permitió estimar la biodiversidad de las unidades de muestreo, pero en base a la distribución numérica de los individuos de las diferentes especies, en función del número de individuos existentes en la muestra analizada, este índice no considera el valor de importancia de las especies, solo se basa en el número de especies presentes, se lo obtuvo mediante la fórmula $Dmg = \frac{(S-1)}{\ln N}$, donde S es el número de especies y N es el número total de individuos. Los valores de los índices se compararon mediante un análisis de la varianza.

Además se compararon los valores de abundancia de las familias presentes en cada unidad experimental.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Elaboración y Caracterización de Extractos

Los parámetros físicos medidos en los extractos son los mostrados en la Tabla 6.

TABLA 6. PARÁMETROS FÍSICO - QUÍMICOS DE LOS EXTRACTOS

EXTRACTO	PH	CONDUCTIVIDAD
<i>CBE-PAT-FP-001</i>	7.25	522
<i>CBE-PAT-FP-002</i>	6.5	620

La concentración de determinados compuestos en los extractos vegetales es muy variable y dependen exclusivamente de la parte la planta con la que se realizó el extracto y el medio de extracción. Estos cambios de concentración de los compuestos, permitieron la variación de algunos de los parámetros físicos medidos en esta investigación.

El pH resulta determinante en el estudio de actividad biológica, puesto que los seres vivos empleados en estas pruebas pueden ser o no sensibles a cualquier cambio en el medio en el que se esté ejecutando el ensayo (solvente: agua). En el caso del caracol *Pomacea canaliculata*, se conoce que reacciona negativamente en ambientes en los que el pH es extremadamente bajo.

El contenido de sales, medido a través de la conductividad eléctrica es otro parámetro físico de interés, puesto que cualquier molusco del mismo ORDEN, muere por deshidratación al entrar en contacto con sales; Estas consideraciones evitaron emitir conclusiones erradas.

3.2. Bioensayos en Laboratorio

El Análisis de la Varianza no paramétrico (Kruskal Wallis) separó las medias de los tratamientos en tres grupos, no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos: Endosulfán, 1000 mgL⁻¹, 750 mgL⁻¹ y 500 mgL⁻¹ de CBE-PAT-FP-001. Se logró una mortalidad de caracoles superior al 90% usando el extracto acuoso de CBE-PAT-FP-001. La mejor media se obtuvo usando la concentración de 1000 mgL⁻¹ que es estadísticamente igual al tratamiento químico basado en Endosulfán ($p \leq 0,05$). Las dosis bajas de

CBE-PAT-FP-001 en laboratorio resultaron estadísticamente iguales al testigo negativo en el que se aplicó agua destilada. La mortalidad en el testigo negativo basado en agua destilada fue del 0% y el testigo positivo del 100%.

TABLA 7. COMPARACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE MORTALIDAD DE *P. CANALICULTA* EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ACUOSO DE CBE-PAT-FP-001 EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Tratamientos	Número de individuos evaluados ^φ	Porcentaje de mortalidad ^χ	Valor p	HTest
Test - ^δ	40	0,00 ±0,00 a	0,0003*	24,12
SM_150 ppm ^β	40	0,00 ±0,00 a		
SM_250 ppm	40	47,50 ±10,3 a b		
SM_500 ppm	40	77,50 ±6,29 a b c		
SM_750 ppm	40	90,00 ±4,08 b c		
SM_1000ppm	40	97,50 ±2,50 c		
Test + ^γ	40	100,00 ±0,00 c		

*Medias con letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

^δConsistió en agua destilada.

^βSM: Extractos a base de CBE-PAT-FP-001

^γConsistió en la aplicación de Endosulfán a dosis recomendada por el fabricante

^φSe emplearon 10 caracoles por repetición y los tratamientos se replicaron 4 veces.

^χ $\bar{x} \pm \text{sem}$; $\text{sem} = \sqrt{\sigma^2/n}$

Adicionalmente se calculó la dosis letal media a partir de los datos de sobrevivencia obtenidos en cada una de las concentraciones del extracto acuoso de CBE-PAT-FP-001. La figura 3.1 muestra una gráfica de regresión lineal simple mediante la cual se obtuvo el valor DL50.

La dosis letal media de 262. 25, indica que una concentración de extracto acuoso de CBE-PAT-FP-001 de 262 elimina

aproximadamente el 50% de la población de caracoles. La ecuación empleada para determinar la DL_{50} fue:

$$Y = 100 \cdot A1 / (X + A1)$$

En donde:

Y: variable respuesta (Y=100% when X=0)

X: concentración del extracto

A1: DL_{50}

Restricciones: $A1 > 0$

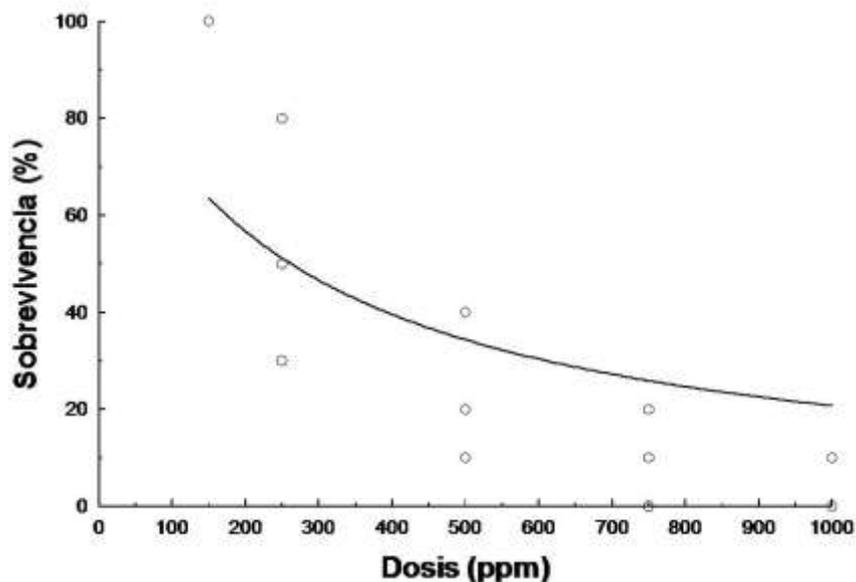


FIGURA 3.1. GRÁFICA DE LA DOSIS LETAL MEDIA DE LAS CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO ACUOSO DE CBE-PAT-FP-001 EN LABORATORIO.

La dosis letal media de las concentraciones del extracto etanólico de CBE-PAT-FP-002 no fue determinada, debido a que los valores máximos de mortalidad fueron de 23 y 25%. Sin embargo, el análisis de la varianza efectuado, separó las

medias de los diferentes tratamientos en cuatro grupos, la dosis de 1000 mgL⁻¹ son estadísticamente iguales al tratamiento control positivo en el que empleó Endosulfán. Los demás tratamientos no presentaron mortalidad significativa por lo que son estadísticamente iguales al control negativo que consistió en agua destilada

TABLA 8. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CBE-PAT-FP-002 EN LABORATORIO

Tratamientos	Número de individuos evaluados ^o	Porcentaje de mortalidad ^z	Valor p	H Test
Test - ^δ	40	0,00 ±0,00 a	0,0005*	21,83
VP_150 ppm ^β	40	0,00 ±0,00 a		
VP_250 ppm	40	3,00 ±0,03 a b		
VP_500 ppm	40	10,00 ±0,04 a b c		
VP_750 ppm	40	25,00 ±0,03 b c d		
VP_1000ppm	40	23,00 ±0,06 c d		
Test + ^γ	40	100,00 ±0,00 d		

*Medias con letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas (p<= 0,05)

^δConsistió en agua destilada.

^βVP: Extractos a base de **CBE-PAT-FP-002**

^γConsistió en la aplicación de Endosulfán a dosis recomendada por el fabricante

^oSe emplearon 10 caracoles por repetición y los tratamientos se replicaron 4 veces.

^z $\bar{x} \pm \text{sem}$; $\text{sem} = \sqrt{\sigma^2/n}$

Los mejores resultados de mortalidad de los caracoles se obtuvieron con la utilización del extracto acuoso de CBE-PAT-FP-001, en el que se obtuvieron porcentajes de mortalidad superiores al 90% y estadísticamente iguales a los valores de mortalidad obtenidos con el endosulfán. Los valores de mortalidad obtenidos con la aplicación del extracto alcohólico de CBE-PAT-FP-002, son muy bajos y no justifican su uso en

campo y/o posterior investigación. Sin embargo, considerando que las características físico-químicas de los extractos pueden variar por múltiples parámetros analizados anteriormente, consideramos que el proceso de obtención de los bioproductos debe ser estandarizado y se deben realizar ensayos de bioactividad con otras partes de la planta que pueden incluir tallo, frutos o raíces. Por otro lado, el efecto inhibitorio de los extractos alcohólicos de CBE-PAT-FP-002 sobre *P. canaliculata* obtenidos en laboratorio, se mantienen en campo

3.3. Bioensayos en Campo

La diferencia de los tratamientos evaluados en campo fue determinada mediante un análisis de la varianza. Previamente, un diagrama de perfiles multivariados (Figura 3.2) con los diferentes conjuntos de datos de las evaluaciones periódicas realizadas permitió determinar y analizar la evolución del nivel de daño en los tratamientos.

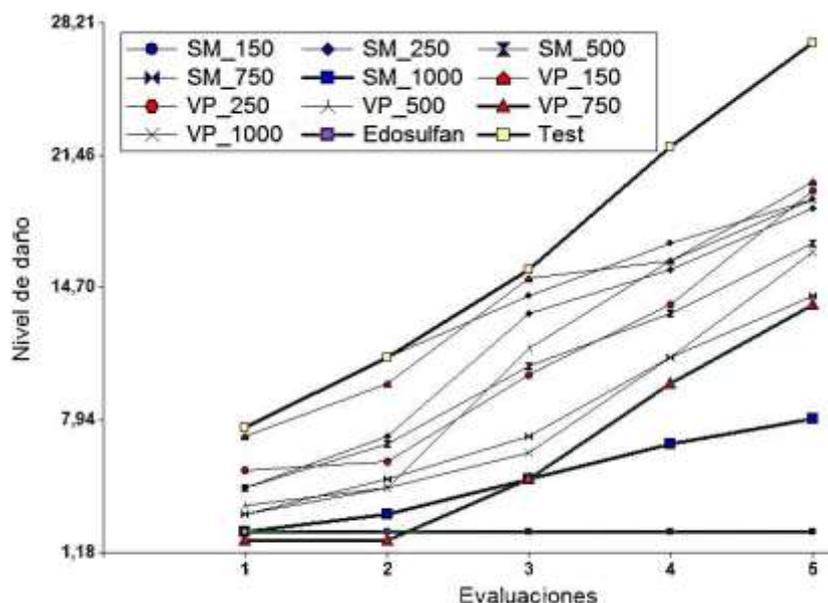


FIGURA 3.2 DIAGRAMA DE PERFILES MULTIVARIADO, EVOLUCIÓN DE LOS EXTRACTOS EN EL CAMPO

La tendencia del nivel de daño a incrementar en todos los tratamientos se mantiene a medida que se incrementa el tiempo de evaluación. El índice de daño en el tratamiento Endosulfán se mantiene constante durante el periodo de evaluación. El promedio de nivel de daño en el tratamiento Endosulfán es el menor, no así en el tratamiento testigo absoluto que presentó los niveles más altos durante todas las evaluaciones medidas.

Los tratamientos: CBE-PAT-FP-001 a 1000 mgL^{-1} (SM_1000) y CBE-PAT-FP-002 a 750 mgL^{-1} (VP_1000) resultaron en porcentajes de daño inferiores y estadísticamente iguales al tratamiento con endosulfán. Sin embargo, se observa un desacelerado crecimiento del porcentaje de daño en el

tratamiento de CBE-PAT-FP-001 (1000 mgL^{-1}) en comparación con el tratamiento CBE-PAT-FP-002 a dosis de 750 mgL^{-1} . Debido a que en los ensayos de laboratorio se consiguió la mortalidad de los caracoles únicamente en los tratamientos que contenían CBE-PAT-FP-001, no así en los tratamientos con CBE-PAT-FP-002 en los que la mortalidad fue baja; se llega a la conclusión de que en condiciones de campo CBE-PAT-FP-001 ocasiona la mortalidad de los caracoles, por lo que el porcentaje de daño tiende a estabilizarse en el tiempo de evaluación, al contrario, con CBE-PAT-FP-002, solo se promueve la inhibición e inmovilización de los moluscos, que en el transcurso del tiempo se restablecen y vuelven a consumir las plántulas de arroz.

Los porcentajes de daños de la segunda evaluación fueron usados para determinar diferencias de las medias entre los tratamientos, se seleccionó tal conjunto de datos, puesto que cumple todos los supuestos para realizar el Análisis de la varianza. Se realizaron las comparaciones mediante el estadístico DMS (Diferencia mínima significativa) al 5% de significancia. No existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos: CBE-PAT-FP-002 al 750 mgL^{-1} , CBE-PAT-FP-001 1000 mgL^{-1} y Endosulfán, obteniéndose los

porcentajes de daño más bajos de *P. canaliculata*. El coeficiente de variación es aceptable (Tabla 7).

TABLA 9. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE DAÑO ENCADA DOSIS

Tratamientos	Porcentaje de daño	Valor p	F Test	CV (%)
VP_750 ppm	1,79 ±0,85 a	<0,0001*	6,61	23,11
Test + γ	2,23 ±0,52 a b	0,1603**	1,83	
SM_1000ppm	3,12 ±0,45 a b c			
VP_500 ppm	4,46 ±1,52 b c d			
VP_1000ppm	4,46 ±1,26 b c d			
SM_750 ppm	4,91 ±1,52 b c d			
VP_250 ppm	5,8 ±1,12 c d e			
SM_500 ppm	6,7 ±0,45 d e			
SM_250 ppm	7,14 ±3,3 d e f			
VP_150 ppm ^β	9,82 ±1,69 e f			
Test - ^δ	11,16 ±1,15 f			
SM_150 ppm ^β	11,16 ±0,73 f			

*Medias con letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

**Medias con letras diferentes, indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre bloques

^δNo se aplicó ningún producto.

^βSM: Extractos a base de CBE-PAT-FP-001

^βVP: Extractos a base de CBE-PAT-FP-002

^γConsistió en la aplicación de Endosulfán a dosis recomendada por el fabricante

^εSe emplearon 10 caracoles por repetición y los tratamientos se replicaron 4 veces.

$\bar{x} \pm \text{sem}$; $\text{sem} = \sqrt{\sigma^2/n}$

3.4. Diversidad de Artrópodos

Dos grupos de interés en estudios de biodiversidad y ampliamente usados como bio-indicadores se lograron identificar del total de individuos colectados en las redes entomológicas.

Las familias fueron: *Tetragnathidae* del orden ARANEA y *Braconidaede* HYMENOPTERA. Los primeros, conocidos

ampliamente como depredadores de plagas en el arroz y el segundo grupo caracterizado por parasitar huevecillos de Lepidópteros plaga.

Solo se lograron capturar individuos de estas dos familias en todas las unidades de muestreo en las que se aplicaron los tratamientos basados en CBE-PAT-FP-001 y CBE-PAT-FP-002. El tratamiento basado en Endosulfán, solo registró 1 familia común de insectos: Culicidae. La riqueza específica de familia se observa en el gráfico de barras (Figura 3.3).

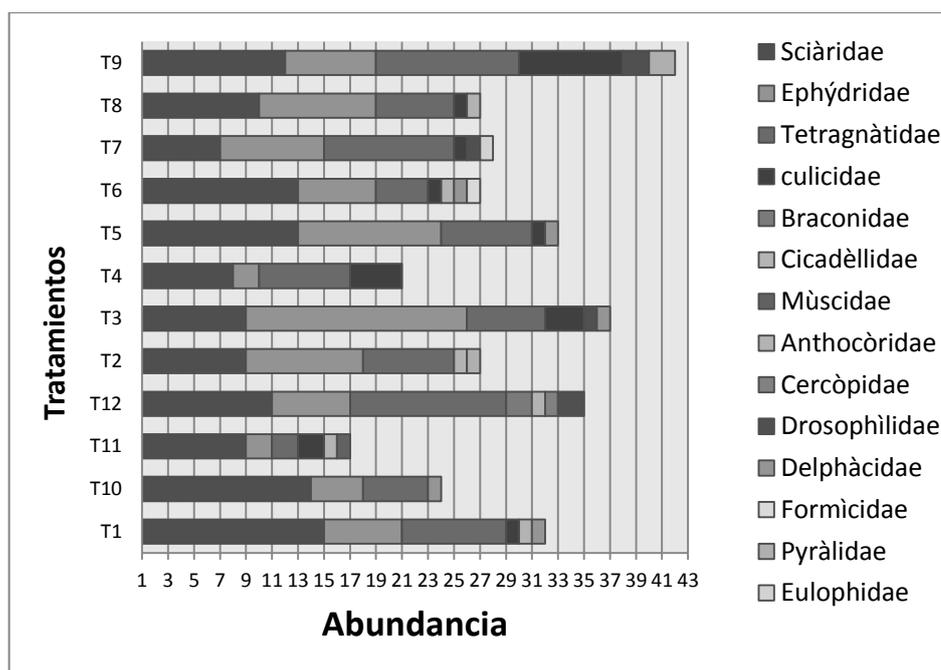


FIGURA 3.3 ABUNDANCIA DE FAMILIAS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

La diversidad de familias se midió mediante el índice de Margalef (Da), los resultados se presentan en la Tabla 8. Se observa, que el índice de diversidad más bajo lo presenta el tratamiento Endosulfán cuyo valor es de 0,25. Los índices de diversidad más altos se agrupan en la categoría B del análisis de la varianza (Tabla 9).

TABLA 10. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE DAÑO EN CADA DOSIS

<i>Tratamientos</i>	<i>Índice de diversidad de Margalef (Da)^ε</i>	<i>F test</i>	<i>Valor p</i>	<i>%CV</i>	<i>SEM</i>
<i>Endosulfán^α</i>	0,25 ± 0,14 a	1,5587	0,155	45,4	0,0821
<i>Extracto_B_1000^β</i>	0,45 ± 0,14 a b				
<i>Extracto_B_500</i>	0,54 ± 0,14 a b				
<i>Extracto_B_250</i>	0,55 ± 0,14 a b				
<i>Extracto_A_750^γ</i>	0,56 ± 0,14 a b				
<i>Extracto_A_1000</i>	0,59 ± 0,14 a b				
<i>Extracto_B_150</i>	0,64 ± 0,14 a b				
<i>Extracto_A_150</i>	0,74 ± 0,14 b				
<i>Control^δ</i>	0,79 ± 0,14 b				
<i>Extracto_A_500</i>	0,8 ± 0,14 b				
<i>Extracto_B_750</i>	0,82 ± 0,14 b				
<i>Extracto_A_250</i>	0,9 ± 0,17 b				

^α Insecticida organofosforado de acción residual

^β Insecticida de origen vegetal tipo B, el número indica la concentración en mgL⁻¹

^γ Insecticida de origen vegetal tipo A.

^δ Control negativo, no se realizaron aplicaciones de productos insecticidas.

^ε Índice calculado para determinar la diversidad entre comunidades, Da ± Sem

El bajo índice de diversidad medido en las unidades experimentales en las que se empleó el insecticida Endosulfán obedece a la toxicidad de este y refleja la pérdida de varios grupos de insectos, incluidos, los de la familia

Tetragnathidae, *Bacónidae*, *Eulóphidae*, etc. Recientemente, se han reportado en el Ecuador un sinnúmero de eventos de desequilibrio biológico en los agroecosistemas de arroz. Tal es el caso de los brotes de *Tagosodes orizicolus*, y con esta la emersión del virus de la hoja blanca en variedades que se creían resistentes. Por otra parte, también se han reportado brotes de *Diatraea sp*, *Rupela albinella* y otras especies de lepidópteros cuyos parasitoides han desaparecido. Los desbalances, según la presente investigación se atribuyen a la desmesurada aplicación de productos como el Endosulfán para la supresión del caracol manzana en el arroz. Por otro lado los presentes resultados permiten comprender el impacto negativo sobre el ambiente del ampliamente utilizado Endosulfán.

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Se determinó que el extracto acuoso CBE-PAT-FP-001 produce una mortalidad promedio de los caracoles superior al 90%, similar estadísticamente al control ejercido por endosulfán.
- La mortalidad ocasionada por el extracto etanólico CBE-PAT-FP-002 en condiciones de laboratorio fue baja, alrededor de 25% (valor máximo). Sin embargo, se observó una inhibición de la actividad de los caracoles en los ensayos de campo disminuyendo el porcentaje de daño al menos en las dos primeras evaluaciones.
- Se registró la presencia de reguladores naturales pertenecientes a las familias: *Tetragnathidae* y *Bracónidae*, en todas las unidades experimentales, excepto en las unidades

experimentales en las que se aplicó endosulfán con lo que se comprobó el impacto ecológico negativo del uso de este producto tóxico.

- Se explicó además de manera científica que el resurgimiento de plagas en el cultivo puede ser ocasionado por la nula presencia de artrópodos benéficos en las parcelas. El índice de diversidad de Margalef más bajo se tabuló con los datos de abundancia de las especies en el tratamiento endosulfán, el testigo absoluto y las concentraciones los extractos vegetales testeados.

- Los escenarios de desbalances biológicos ocasionados en los agro-ecosistemas de arroz pueden ser atribuidos la aplicación desmesurada de insecticidas organoclorados cuyo efectos mortales sobre la diversidad de artrópodos se presentan en este trabajo.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda la continuidad de la investigación de bioproductos en mezclas a diferentes proporciones para alcanzar una mortalidad más cercana 100% de los caracoles en invernadero y campo.
- Recomendamos la sociabilización de los presentes resultados para la adopción por parte de los productores de arroz.
- Se recomienda la identificación de las estructuras químicas responsables de la actividad molusquicida.

APÉNDICE 1. DATOS DE LAS EVALUACIONES DIARIAS EN CAMPO (NUMERO DE PLANTAS AFECTADAS POR PARCELA)

DISTRIBUCION TRATAMIENTOS

Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4
T12	T5	T3	T5
T4	T10	T4	T2
T11	T1	T9	T10
T6	T4	T7	T12
T7	T6	T8	T4
T3	T11	T12	T7
T8	T9	T2	T8
T10	T8	T5	T1
T9	T2	T6	T9
T2	T7	T1	T6
T5	T12	T10	T11
T1	T3	T11	T3

DÍA 1

5	4	3	5
1	1	1	1
1	2	2	2
0	1	2	1
3	1	2	2
2	2	5	3
3	3	6	4
1	2	0	2
2	0	2	3
2	2	4	2
3	2	1	4
5	3	5	4

DÍA 2

7	6	4	8
1	1	1	1
3	3	2	2
0	1	2	1
4	1	2	3
2	2	6	3
3	4	11	4
1	2	2	2
3	1	3	4
4	3	6	2
4	3	3	6
7	5	6	7

DÍA 3

10	9	6	10
1	1	1	1
7	3	2	2
2	6	2	1
7	9	5	5
5	7	6	5
7	5	12	10
2	3	6	2
5	3	4	4
7	6	8	3
8	7	7	8
8	8	8	8

DÍA 4

16	9	9	15
1	1	1	1
12	6	2	5
3	7	8	4
8	12	8	10
8	7	12	8
7	6	12	11
2	10	5	7
6	5	12	7
9	7	11	3
8	8	8	11
10	9	9	10

DÍA 5

19	12	10	17
1	1	1	1
15	9	8	5
6	9	10	6
10	13	10	11
12	8	14	10
10	8	14	14
2	12	6	8
10	6	13	9
9	9	13	7
10	9	8	13
12	11	10	10

APÉNDICE 2. DATOS DE MORTALIDAD OBTENIDOS EN EL LABORATORIO (NUMERO DE CARACOLES MUERTOS POR VIAL).

EXTRACTO DE CBE-PAT-FP-001

TRATAMIENTO	REPT	MUERTOS
1	1	0
1	2	0
1	3	0
1	4	0
2	1	2
2	2	5
2	3	7
2	4	5
3	1	9
3	2	6
3	3	8
3	4	8
4	1	9
4	2	8
4	3	10
4	4	9
5	1	9
5	2	10
5	3	10
5	4	10

EXTRACTO DE CBE-PAT-FP-002

TRATAMIENTO	REPT	MUERTOS
6	1	0
6	2	0
6	3	0
6	4	0
7	1	0
7	2	0
7	3	0
7	4	1
8	1	0
8	2	1
8	3	2
8	4	1
9	1	2
9	2	2
9	3	3
9	4	3
10	1	1
10	2	2
10	3	4
10	4	2

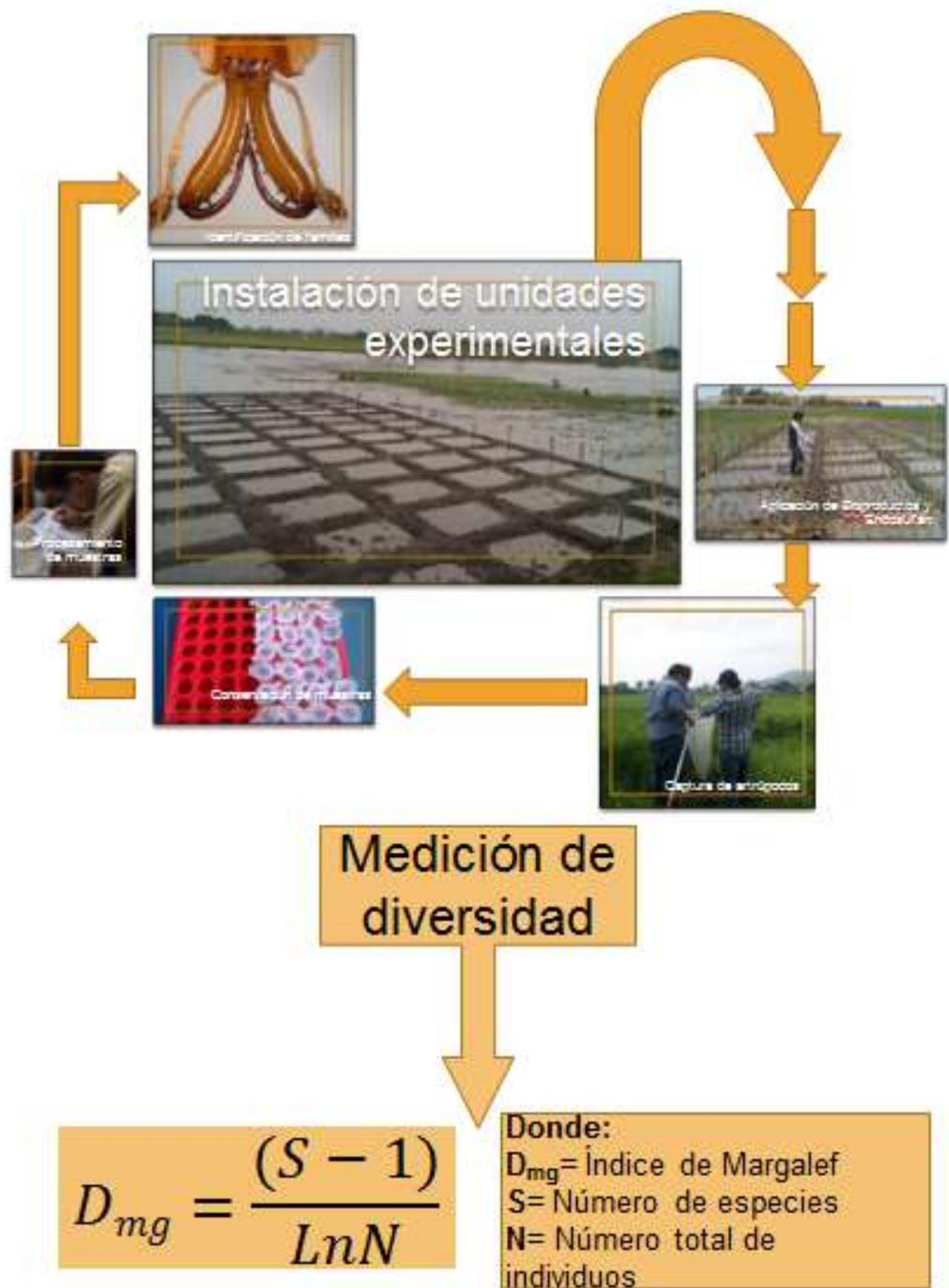
TESTIGO POSITIVO (ENDOSULFAN)

TRATAMIENTO	REPT	MUERTOS
11	1	10
11	2	10
11	3	10
11	4	10

TESTIGO NEGATIVO (SIN PRODUCTO)

TRATAMIENTO	REPT	MUERTOS
12	1	0
12	2	0
12	3	0
12	4	0

APÉNDICE 3. METODOLOGÍA PARA LA MEDICIÓN DE LA DIVERSIDAD DE ARTRÓPODOS.



BIBLIOGRAFÍA

1. Pimentel, D.; L. Lach; R. Zuniga & D. Morrison. 2000. Environmental and Economic Costs of non Indigenous Species in the United States. *BioScience* 50: 53-65.
2. Donlan, C.J., and C. Wilcox (2008). Diversity, Invasive Species and Extinctions in Insular Ecosystems. *Journal of Applied Ecology* 45: 1113-1123.
3. Stern, N. 2006. Stern Review: The Economics of Climate Change. HM Treasury, London, UK.
4. Burgiel, S.W. and A.A. Muir. 2010. Invasive Species, Climate Change and Ecosystem- Based Adaptation: Addressing Multiple Drivers of Global Change. Global Invasive Species Programme (GISP), Washington, DC, US, and Nairobi, Kenya.
5. Mitsch, W. J., and J. G. Gosselink. 1993. *Wetlands*. 2nd edition. Van Nostrand Reinhold, New York. (Wetland Restoration and Invasive Species: Apple snail (*Pomacea insularum*) Feeding on Native and Invasive Aquatic Plants)
6. The Apple Snail Website *Pomacea canaliculata* Stijn Ghesquiere, 2003
7. <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=135&fr=1&sts=tss&lang=EN> reviewed by Dr. Robert H. Cowie, Center for Conservation Research and Training, University of Hawaii, USA, 2005

8. Matthias Halwart (1994): The Golden Apple Snail *Pomacea canaliculata* in Asian Rice Farming Systems: Present Impact and Future Threat, *International Journal of Pest Management*, 40:2, 199-206
9. Tomado de la edición virtual del Lunes 26 de Marzo del 2012 Diario El Telégrafo.
10. Correoso, M. 2006. Estrategia preliminar para evaluar y erradicar *Achatina fulica* (Gastropoda: Achatinaceae) en Ecuador. *Boletín Técnico 6, Serie Zoológica 2: 45-52*
11. Fernando Bejarano González et. Al, 2008, El endosulfán y sus alternativas en América Latina
12. Management options for the Golden Apple snail, *Rice technology bulletin*, 2001
13. Jambari Haji Ali and Edi Suryanto, Fish as Biological Control Agent of Golden Apple Snails – Prospects and Challenges, Department of Biology, University Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia
14. Ravindra C. Joshi, Mario S. de la Cruz, Antonio R. Martin, and Angelito V. Duca, Philrice researchers, Long-Horned Grasshoppers Eat Golden Kuhol Eggs News Release - October 29, 2001

15. Yoichi Yusa 2001, Predation on Eggs of the Apple Snail *Pomacea canaliculata* (gastropoda: ampullariidae) by the Fire ant *Solenopsis geminata*

16. Roig-Juñent J. & Debandi G. Prioridades de Conservación Aplicando Información Filogenética y Endemicidad: un ejemplo basado en Carabidae (Coleoptera) de América del Sur austral. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 695-709. 2004.

17. Swiss Agency for the Environment, Forest and Landscape (SAEFL). 2010. Biodiversity Monitoring Switzerland. Suiza. Consultado el 6 de marzo del 2011, disponible en: www.biodiversitymonitoring.ch

18. Feinsinger, P. 2001. *Designing Field Studies for Biodiversity Conservation*. Island Press. Washington, USA. 212 pp.

19. Holloway, J.D. y N.E. Stork. 1991. The dimensions of biodiversity: the use of invertebrates as indicators of human impact. In: D.L. Hawksworth (editor), *The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role In Sustainable Agriculture*, C.A.B, International, Wallingford UK. 302 pp.

20. Mc Geoch, M.A. 1998. The selection, testing, and application of terrestrial insects as bioindicators. *Biological Reviews*. 73 (2): 181-201.

21. Hellawell, J.M. 1986. Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management. Elsevier, Applied Science Publishers, London. 546 pp.
22. Gaston K. J. y Blackburn T. M. (1995). Mapping biodiversity using surrogates for species richness: macro-scales and New World birds. Proceedings of the Royal Society of London B 262, 335-341.
23. Mc Geoch, M.A. 1998. The selection, testing, and application of terrestrial insects as bioindicators. Biological Reviews. 73 (2): 181-201.
24. Fernández F. (ed.). 2003. Introducción a las Hormigas de la región Neotropical.
25. Cowie, Robert. 2002. "Apple snails (Ampullariidea) as Agricultural Pests: their Biology, Impacts and Management" in Molluscs as Crop Pest (ed. G.M. Barker). Pgs. 145-192. CABI Publishing. Wallingford, UK.
26. Joshi, R. C., N. S. Baucas, E. E. Joshi and E. A. Verzola. 2003b. Scientific Information Database on Golden Apple Snail (Pomacea spp.): CDROM. Published by the Department of Agriculture-Cordillera Administrative Region, Da-PhilRice, Da-Charm, Alap (ISBN 971-92558-7-0).
27. Joshi, R. C., M. S. Dela Cruz, A. R. Martin, A. V. Duca, and E. C. Martin. 2002. Relation of Golden Apple Snail Size to Rice Seedling Damage in transplanted and direct -seeded rice cultivation. Int. Rice Res. Newsl. 27(1): 37 -38.

28. Litsinger, J. A. and D. B. Estano. 1993. Management of the GAS (*Pomacea canaliculata* Lamarck) in rice. *Crop Prot.* 12(5): 363-370.
29. Basilio, R. 1991. Problem of golden snail infestation in rice farming. p. 11-12. In: B. O. Acosta and R. S. V. Pullin (eds.) *Environmental impact of the golden snail (Pomacea sp.) on rice farming systems in the Philippines.* Manila: Iclarm.
30. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). 2010. *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC).*
31. Halwart, M. 2001b. Fish as biocontrol agents of vectors and pests of medical and agricultural importance, p.70-75. In IIRR, CIID, FAO, NACA and ICLARM. *Utilizing different aquatic resources for livelihoods in Asia: a resource book.*
32. De Bont A.F and De Bont Hers M.J Molluscs control and fish farming in Central Africa. *Nature.* 1952. 170: 323-324
33. WILSON, E. O. 1992. *The diversity of life.* W. W. Norton & Company. New York. London.
34. MORRO, J. J., D. Espinosa, A. D. Fortino & P. Posadas. 1999. *El Arca de la Biodiversidad.* Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
35. Alzenma, Feisinger Inger P. Bees not to be? Responses of Insect Pollinator Faunas and Flower Pollination to Habitat

Fragmentation. In *How Landscapes Change: Human Disturbance and Ecosystem Fragmentation in the Americas* (Bradshaw GA and Mooney HA, editors.) Springer Verlag: Berlin.; pp. 11–129. 2002

36. Jordano P, Bascompte, Olesen JM. The Ecological Consequences of Complex Topology and nested Structure in Pollination webs. In: *Plant-Pollinator Interactions, from Specialization to Generalization* (Waser N and Ollerton J, editors.). University of Chicago Press, Chicago, IL.;pp. 173–199. 2006.

37. Marquez Luna J. Técnicas de Colecta y Preservación de Insectos. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 37: 385 – 408. 2005.

38. Iannacone J., Alayo M., Arrasque A., SÁNCHEZ J. & ABANTO M. Las Trampas de Luz para Evaluaciones Rápidas de la Biodiversidad de la Artropofauna: Análisis de tres casos. *Wiñay Yachay* (Perú). 5: 7-20. 2001.

39. Salazar N.C. & Iannacone J. Censos rápidos empleando la técnica de Barber para evaluar la artropofauna del Parque Nacional Yanachaga- Chemillén, Sector del Río Pescado, Oxapampa – Pasco. *Boletín de Lima* (Perú). 125: 126-130. 2001.

40. Allaby, M. 1992. *The Concise Oxford dictionary of Zoology*. Oxford University Press, Oxford, 442 pp.

41. Maini, P.N. and B.M. Rejesus. 1990. Annual report on "Sapogenic Plant Materials for Golden Snail (*Pomacea* spp.) Control" Philippine Rice Research Institute (PRRI), Maligaya, Muñoz, Nueva Ecija, Philippines
42. Guerrero, L. M. 1978. Medicinal Plants of the Philippines. Katha Publishing, Inc, Manila.
43. Schumutterer, H.K, R.S. Ascher and H. Rembold. 1981. Natural Pesticides from the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss). Proc. 1st Int. Neem Conf. (R-Egern, 1980), 297 pp.
44. Rane Enriquez Joshi, University Science High School, Central Luzon State University, Science City of Muñoz, Nueva Ecija, Philippines, April 2005, Off-Season Mortality OF Golden Apple Snail, *Pomacea canaliculata* (Lamarck) And Its Management Implications.
45. Meepagaia KM, Kuhajek JM, Sturtz GD, Wedge DE. 2003. Vulgarone B, the antifungal constituent in the steam-distilled fraction of *Artemisia douglasiana*. *Journal of Chemical Ecology* 29:1771–1780.
46. Joshi RC. 2005. The golden apple snail: Raiders of the rice fields. *Outlooks on Pest Management* 16:23–26.
47. Ojewole J A O, Nundkumar N and Adewunmi C O. (2004). Molluscicidal, cercariacidal, larvicidal and antiplasmodial properties of *Barringtonia racemosa* fruit and seed extracts. *Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas (BLACPMA)* 3(5): 88–92.

48. Sparg S G, Light M E and van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* 94(2–3): 219–243.
49. Musri Musman 2010 Toxicity of *Barringtonia racemosa* (L.) Kernel Extract on *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae), Musri Musman* Department of Marine Science, Coordinatorate of Marine Science and Fishery, Syiah Kuala University, Darussalam-Banda Aceh 23111, Indonesia, *Tropical Life Sciences Research*, 21(2), 41–50, 2010
50. Snyder, N.F.R. & H.A. Snyder, 1971. Defenses of the Florida apple snail *Pomacea paludosa*. *Behaviour*, 40(3–4): 175–215.
51. Miranda M, Cuellar A. 2001. *Farmacognosia y productos naturales*. Editorial Félix Varela. Cuba. pp.
52. Who-World Health Organization 1965. Molluscicide screening and evaluation. *Bull Who* 33:567-581.
53. Matthew A. Ciomperlik, David G. Robinson, Ian H. Gibbs, Angela Fields, Timothy Stevens, Timothy Stevens, Brett M. Taylor. 2011. Mortalidad del “Caracol Gigante Africano” *Lissachatina fulica* (Bowdich 1822) y otros moluscos utilizando molusquicidas. USDA APHIS PPQ CPHST, Pest Detection Laboratory, Edinburg, TX, USA
54. Ravindra C. Joshi, Kumidini M. Meepagala, George Sturtz, Arsenia G. Cagauan, Christopher O. Mendoza, Franck E. Dayan & Stephen O. Duke , (2005): Molluscicidal activity of

vulgarone B from *Artemisia douglasiana* (Besser) against the invasive, alien, mollusc pest, *Pomacea canaliculata* (Lamarck), *International Journal of Pest Management*, 51:3, 175-180

55. Márquez Luna J., 2005 Técnicas de colecta y Preservación de Insectos. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, 37: 385 – 408.

56. Martini R. L., 2011 caracterización morfológica del *angiostrongylus cantonensis* utilizando microscopia de luz y microscopia electronica.

57. Boland, B. B., Meerhoff, M., Fosalba, C., Mazzeo, S., Barnes, M. A., & Burks, R. L. (2008). Juvenile Snails , Adult Appetites: Contrasting Resource Consumption Between two Species of Apple snails (*Pomacea* sp.). *Journal of Molluscan Studies*, (January), 47-54. doi:10.1093/mollus/eym045

58. Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins Ricardo San Martín, Karine Ndjoko, Kurt Hostettmann

59. Ravindra C. Joshi, Leocadio S.. Sebastian 2006 - 588 páginas, Global advances in ecology and management of golden apple snails, Philippine Rice Research Institute

60. Comisión para la Cooperación Ambiental de Norteamérica (CCA). 2001 Prevención de la Introducción y Propagación de Especies Invasoras Acuáticas en América del Norte: Actividades del Taller, 28 al 30 de Marzo 2001. 81 pp.

61. Quinn, T. P.; M. J. Unwin & M. T. Kinnison. 2000. Evolution of temporal isolation in the wild: genetic divergence in

timing of migration and breeding by introduced chinook salmon populations. *Evolution* 54: 1372-1385.

62. Sakai, A. N.; F. W. Allendorf; J. S. Holt; D. M. Lodge; J. Molofsky; K. A. With; S. Baughman; R. J. Cabin; J. E. Cohen; N. C. Ellstrand; D. E. McCauley; P. O'Neil; I. M. Parker; J. N. Thompson & S. G. Weller. 2000. Annual Reviews of Ecology and Systematics 32: 305-332.

63. Levine, J. M. & C. M. D'Antonio. 1999. Elton revisited: a review of evidence linking diversity and invasibility. *Oikos* 87: 15-26.

64. Levin, D. A.; J. Francisco-Ortega & R. K. Jansen. 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conserv. Biol.* 10: 10-16.

65. Perry, W. L.; J. L. Feder & D. M. Lodge. 2001. Hybrid zone dynamics and species replacement between *Orconectes* crayfishes in a northern Wisconsin lake. *Evolution* 55: 1153-1166.

66. Ellstrand, N. C. & K. A. Schierenbeck. 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 7043-7050.