

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



EFFECTO BIOCONTROLADOR DE LA CEPA *Trichoderma inhamatum* BOL 12 QD-1 SOBRE EL FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea* CAUSANTE DE LA MANCHA CHOCOLATE EN CULTIVOS DE HABA DE LA COMUNIDAD DE CHIRAPACA

Postulante: Jimmy Ciancas Jiménez

**Asesores: María Teresa Álvarez Aliaga Ph.D.
Alberto Giménez Turba Ph.D.**

Área: Biotecnología Microbiana

Tesis de Grado para Optar al Título de Magíster Scientiarum

LA PAZ – BOLIVIA

Septiembre, 2006



Tesis de grado
Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas

Efecto biocontrolador de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre el fitopatógeno *Botrytis cinerea* causante de la mancha chocolate en cultivos de haba de la comunidad de Chirapaca.

Investigación realizada dentro del proyecto “Biodiversidad Microbiana del Programa UMSA-SAREC” con cooperación del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Lund – Suecia”

Desarrollada en la unidad de Biotecnología Ambiental – Área de Control Biológico del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas – IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Asesores: Ph.D. María Teresa Álvarez Aliaga
Ph.D. Alberto Giménez Turba

Autor: Lic. Jimmy Casto Ciancas Jiménez

Septiembre 2006

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
FEDEPAPA	Federación de Productores de Papa
ha	Hectárea
IIFB	Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas
INE	Instituto Nacional de Estadística
Kg	Kilogramo
MACA	Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios
MeOH	Metanol
MIP	Manejo Integral de Plagas
mL	mililitro
nm	nanómetro
ppm	partes por millón
PROBIOMA	Productividad Biosfera y Medio Ambiente
PROBIOTEC	Centro de Capacitación Investigación, Diagnóstico y Producción de Biorreguladores
PROINPA	Programa de Investigación de la Papa
rpm	revoluciones por minuto
t	toneladas métricas
µg	microgramos
µL	microlitros

“De todas las dotes de la mente la que más escasea es la paciencia intelectual; y la última lección que se aprende es la de saber afrontar ante dificultades que no se habían previsto”.
Wedgwood.

**Este trabajo esta dedicado a mis
padres Casto y Leonor y mis
hermanos Gustavo y Fabiola**

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas las personas e instituciones que colaboraron en la realización de esta tesis.

A la Agencia Internacional de Cooperación Sueca ASDI-SAREC, cuyo Financiamiento hizo realidad el proyecto Biodiversidad Microbiana, que se ejecuta en el Área de Biotecnología del IIFB.

Gracias a la Cooperación Belga por la beca otorgada en las gestiones 2004-2005 para mis estudios de posgrado en la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas.

A la fundación Alexander von Humboldt-Staftung de Alemania, por la donación de equipos.

A la Facultad de de Bioquímica y Farmacia de la Universidad Mayor de San Andrés, por el apoyo brindado durante el desarrollo del trabajo.

Gracias, Dr. Alberto Jiménez, por la paciencia, asesoramiento continuo para seguir adelante y darme la oportunidad de formar parte del IIFB.

A la Dra. Teresa Álvarez, por su asesoramiento, continuo apoyo y colaboración en el presente trabajo, pero lo más importante su amistad.

Al Dr. Udaeta, por el apoyo y su amistad.

Al Dr. Enrique Terrazas, por apoyarme en los momentos difíciles y sus palabras de aliento durante mi estancia.

A la Dra. Gracy Ruiz, por sus consejos.

A los Sres. Jorge Chavez y Angelica Lizárraga, un cariño especial por todo el apoyo brindado y auxiliarme durante mi estancia.

A quienes fueron docentes en la maestría, por compartir sus conocimientos.

Un agradecimiento especial para mi amiga incondicional Georgina.

A Deyni, Noemi y Ana Gabriela con quienes compartí buenos y malos momentos.

A Paola Astorga por otorgarme las cepas biocontroladoras y dar las luces para el inicio de este trabajo.

A la Dra. Teresa Álvarez y Laura Mendoza, por ayudarme en la identificación molecular del hongo.

Para mis compañeros y compañeras del IIFB: Lencho, Efraín, Oso, Marco, Crispín, Pamela Mónica, Delia, Carla, Magui, Lucía, Kathia y dr. Ávila con quienes tuve la fortuna de trabajar.

Obviamente, debo agradecer a mi papá y mi mamá quienes me financiaron durante estos dos años.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT

RESUMEN

ABREVIACIONES

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. Introducción	1
1.2 Antecedentes	2
1.2.1 Antecedentes Nacionales	2
1.2.2 Antecedentes Internacionales	3
1.3 Justificación	6

CAPITULO 2

CARACTERÍSTICAS BOTÁNICO PRODUCTIVAS DE LA PLANTA DE HABA Y PAPA

2.1 Características generales de la planta de haba	7
2.2 Importancia del cultivo de haba en Bolivia	8
2.3 Consecuencias en la producción de haba en Bolivia debido a la infección por fitopatógenos	9
2.4 Características generales de la planta de papa	10
2.5 Importancia del cultivo de papa en Bolivia	10
2.6 Consecuencias en la producción de papa en Bolivia debido a la infección por fitopatógenos	11

CAPITULO 3

PATÓGENOS QUE ATACAN LOS CULTIVOS DE HABA Y PAPA

3.1 Patógenos que atacan los cultivos de haba	13
3.2 Patógenos que atacan los cultivos de papa	13
3.3 Hongos fitopatógenos	14
3.3.1 Moho gris (<i>Botrytis cinerea</i>)	14
3.3.2 Síntomas y ciclo de la enfermedad	15
3.3.3 Tizón temprano de la papa (<i>Alternaria solani</i>)	16
3.3.4 Síntomas y ciclo de la enfermedad	17

CAPITULO 4

CONTROL BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN CULTIVOS DE HABAY PAPA

4.1 Control biológico	18
4.2 Los hongos como agentes de biocontrol	19
4.3 Microorganismos antagónicos	19
4.3.1 <i>Trichoderma</i> sp.	20
4.4 Medios de control físico y químico de fitopatógenos	21
4.4.1 <i>Botrytis cinerea</i>	21
4.4.2 <i>Alternaria solani</i>	22

CAPITULO 5

PRODUCCIÓN DE BIOCONTROLADORES

5.1 Hongos productores de antifúngicos	26
5.2 Metabolismo secundario	26
5.3 Pigmentos	27
5.3.1 <i>Trichoderma</i> sp.	27
5.4 Control de calidad de la producción de antimicrobianos a nivel de laboratorio	27

CAPITULO 6

TECNOLOGÍAS DE APLICACIÓN DE BIOCONTROLADORES *IN VIVO*

6.1 Formas de aplicación de <i>Trichoderma</i> sp.	29
6.2 Control de enfermedades de los órganos aéreos de las plantas mediante el uso de hongos	30
6.3 Control biológico dentro del manejo integrado de plagas	30
6.4 Medios de propagación de <i>Trichoderma</i> sp. y posibilidades de industrialización	31

CAPITULO 7

OBJETIVOS

7.1 Objetivo General	33
7.2 Objetivos específicos	33

CAPITULO 8

DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1 Material y métodos	34
8.1.1 Material biológico	34
8.1.1.1 Microorganismos antagonicos	34
8.1.1.2 Microorganismos fitopatógenos	34
8.2 Activación de cepas antagonistas y fitopatógenas	35
8.2.1 Obtención de cultivos monospóricos	35
8.2.2 Cultivos de punta de hifa	35
8.3 Identificación macroscópica y microscópica de hongos saprofitos	35
8.3.1 Examen macroscópico en placa	36
8.3.2 Examen microscópico sobre cubreobjetos	36
8.4 Antagonismo en cultivo	37
8.4.1 Método directo	37
8.4.2 Método indirecto	38
8.5 Cultivos en lote para la obtención de metabolitos secundarios	39
8.6 Evaluación de la actividad antifúngica	41
8.7 Determinación de la actividad antifúngica	41
8.8 Medición de la actividad inhibitoria del crecimiento de los fitopatógenos	41
8.9 Bioensayo en gota	43
8.9.1 Cámara húmeda	43
8.10 Fase de invernadero	43
8.10.1 Fase de pretratamiento	43
8.10.2 Producción de esporas de <i>Alternaria solani</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	43
8.10.2 Tratamientos en invernadero	43
8.10.2 .1 Prueba de porcentaje de germinación	44
8.10.3 Preparación de materiales para las pruebas de invernadero	44
8.10.4 Pruebas de biocontrol en cada tratamiento	44
8.10.5 Parámetros a evaluar en la plántula	47
8.10.5.1 Tallo, peso fresco y seco de la plántula por cada tratamiento	47
8.11 Estudios cromatográficos	47
8.11.1 Obtención de extractos	47
8.11.2 Evaluación de la actividad antifúngica por el método de Mitscher	48
8.11.3 Determinación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i>	51
8.11.4 Fraccionamiento químico biodirigido del extracto de la cepa con mejor actividad antifúngica	52

8.11.5 Cromatografía en sílice (TLC)	52
8.12 Fase de campo	52
8.12.1 Establecimiento de la parcela experimental	54
8.12.2 Variables experimentales	56
8.12.2.1 Aplicación de tratamientos	56
8.12.2.2 Determinación de la concentración de extractos para la aplicación en el tratamiento de la mancha chocolate en cultivos de haba	56
8.12.3 Variables de respuesta	57
8.12.4 Formulación de los productos biológicos para la aplicación en el cultivo	57
8.12.5 Aplicación de los extractos al cultivo de haba	58
8.12.6 Pruebas de biocontrol en cada tratamiento	58
8.12.7 Determinación de la incidencia de la enfermedad	60
8.12.8 Determinación de la severidad de la enfermedad	60
8.12.9 Determinación de la eficiencia de los extractos naturales	60
8.13 Identificación molecular de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1	61

CAPITULO 9

RESULTADOS

9.1. Efecto del filtrado obtenido en condiciones no agitadas de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1 sobre el crecimiento	62
9.2 Bioensayo en gota	63
9.3 Pruebas en invernadero	64
9.3.1 Control de <i>Botrytis cinerea</i>	64
9.3.2 Control de <i>Alternaria solana</i>	67
9.3.3 Evaluación de las variables de estudio	69
9.3.3.1 Longitud de las plántulas	69
9.3.3.2 Peso fresco	73
9.3.3.3 Peso seco	76
9.4 Estudios cromatográficos	79
9.4.1 Rendimiento de las fracciones	79
9.4.2 Resultados de la actividad biológica	80
9.4.2.1 Evaluación antifúngica y parasitaria de los fracciones obtenidas de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol12 QD-1 en placas de 24 pozos (Mitscher)	80
9.4.3 Presencia de metabolitos activos	83
9.5 Pruebas en campo	84

9.5.1 Efecto de los extractos obtenidos de <i>Trichoderma inhamatum</i> . Bol 12 QD-1 en el control de la mancha chocolate en campo	84
9.5.1.1 Incidencia de la enfermedad mancha chocolate en el cultivo de haba	84
9.5.1.2 Gravedad de la enfermedad mancha chocolate sobre el cultivo de haba	85
9.5.1.3 Efecto de dosis de extractos utilizados para el control de la mancha chocolate	86
9.5.2 Efecto en el rendimiento	87
9.5.2.1 Número de vainas por planta	87
9.5.2.2 Evaluación de la longitud de vaina por planta, tratamiento dosis	88
9.5.2.3 Peso de 100 semillas	88
9.5.2.3.1 Peso de 100 semillas por tratamiento en gramos	88
9.5.3 Rendimiento vaina	89
9.5.4 Rendimiento en grano seco	90
9.6 Caracterización filogenética de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol12 QD-1	91

CAPITULO 10

DISCUSIONES

10.1 Actividad biológica inhibitoria <i>in vitro</i> de los filtrados de cultivo de hongos biocontroladores	93
10.2 Prueba de toxicidad	94
10.3 Pruebas en invernadero	95
10.4 Estudios cromatográficos	96
10.5 Pruebas en campo	97
10.5.1 Incidencia de la enfermedad mancha chocolate en el cultivo de haba	97
10.5.2 Severidad de la enfermedad mancha chocolate sobre el cultivo de haba	98
10.5.3 Eficiencia de dosis de extractos utilizados para el control de la mancha chocolate	98
10.5.4 Efecto en el rendimiento	98
10.5.4.1 Número de vainas por planta	98
10.5.4.2 Longitud de vaina	98
10.5.4.3 Peso de 100 semillas	99
10.5.5 Rendimiento en vaina	99
10.5.6 Rendimiento en grano seco	99
10.5.7 Análisis final	100
10.6 Identificación molecular de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol12 QD-1	100

CAPITULO 11

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

11.1 Conclusiones 102

11.2 Recomendaciones 103

FIGURAS

Figura 1. Desarrollo simultáneo de antagonista y patógeno en medio PDA. (Prueba Directa, enfrentamiento dual).	37
Figura 2. Desarrollo del patógeno en sustrato tratado con la adición de una alícuota del antagonista. Prueba indirecta (Método de excavación en placa).	38
Figura 3. Obtención de metabolitos activos de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1 producidos en cultivo homogeneizado.	40
Figura 4. Actividad antifúngica de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1	42
Figura 5. Obtención de tres fracciones del fermento de 950 mL de cultivo (caldo papa dextrosa) con la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1.	48
Figura 6. Evaluación de los extractos (amarillo, rojo y remanente) en placas de ELISA denominadas TC24 a diferentes concentraciones.	51
Figura 7. Mapa de la región de Chirapaca	53
Figura 8. Establecimiento de la parcela experimental para la aplicación de los extractos obtenidos en laboratorio, en el control de la mancha chocolate en cultivos de haba	55
Figura 9. Curva de crecimiento del frente hifal de la cepa <i>Botrytis cinerea</i> C- = Control negativo (Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i>) y T+ = Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en el medio de cultivo homogeneizado con el filtrado obtenido de los cultivos en batch de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1.	62
Figura 10. Curva de crecimiento del frente hifal de la cepa <i>Alternaria solani</i> C- = Control negativo (Crecimiento de <i>Alternaria solani</i>) y T+ = Crecimiento de <i>Alternaria solani</i> en el medio de cultivo homogeneizado con el filtrado obtenido de los cultivos en batch de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1.	63
Figura 11. Bioensayo en gota.	64
Figura 12. Porcentaje de supervivencia de <i>Botrytis cinerea</i> por efecto del filtrado de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1 en plantulas de haba.	65

Figura 13. Porcentaje de supervivencia de <i>Alternaria solani</i> por efecto del filtrado de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1 en plantulas de haba.	67
Fig. 14. Frecuencia del peso fresco en mg por cada tratamiento.	73
Fig. 15. Frecuencia del peso fresco en mg por cada tratamiento.	75
Figura 16. Frecuencia del peso seco en mg por cada tratamiento.	76
Figura 17. Frecuencia del peso seco en mg por cada tratamiento.	78
Figura 18. Espectro de la fracción amarilla (H ₂ O/MeOH: 60/40) obtenido de filtrado de cultivo de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1	80
Figura 19. Evaluación de los extractos obtenidos de <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1 sobre el crecimiento de A = <i>Botrytis cinerea</i> y B = <i>Alternaria solani</i> a diferentes concentraciones.	82
Figura 20. Separación de metabolitos activos de la fracción amarilla (H ₂ O/MeOH - 60/40) cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> cepa Bol 12 QD-1 por cromatografía en capa fina.	83
Figura 21. Porcentaje de incidencia del hongo <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de haba.	84
Figura 22. Porcentaje de gravedad de la enfermedad mancha chocolate en el cultivo de haba.	85
Fig 23. Efecto de dosis de extractos utilizados para el control de la mancha chocolate en cultivo de haba.	86
Figura 24. Efecto del producto/dosis sobre el número de vainas por planta.	87
Figura 25. Efecto del producto/ dosis sobre el tamaño de vainas en cm.	88
Figura 26. Efecto del producto /dosis sobre el peso de 100 semillas.	89
Figura 27. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el rendimiento en vaina del cultivo de haba.	90
Figura 28. Efecto de los extractos naturales sobre el rendimiento en grano seco.	91

Figura 29. Árbol filogenético ensamblado, basado en la región rDNA - ITS 92
de la cepa *Trichoderma inhamtum* Bol 12 QD-1 y su relación con las especies.
Fusarium santarosense Bol 35 QD.

TABLAS

Tabla 1. Superficie, rendimiento y producción para diferentes cultivos en Bolivia durante 1999.	8
Tabla 2. Superficie, rendimiento y producción de papa por departamento durante 2004.	11
Tabla 3. Principales daños y síntomas causados por algunos insectos y patógenos en cultivos de haba en el altiplano boliviano.	13
Tabla 4. Principales daños y síntomas causados por algunos patógenos en cultivos de papa en el altiplano boliviano.	14
Tabla 5. Las dosis presentadas fueron calculadas después de la determinación de concentraciones apropiados en el laboratorio.	57
Tabla 6. Análisis de varianza de un factor en plantas atacadas para el tratamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .	65
Tabla 7. Prueba de Duncan en plantas atacadas para el tratamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .	66
Tabla 8. Análisis de varianza de un factor en plantas contrarrestadas para el tratamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .	66
Tabla 9. Prueba de Duncan en plantas contrarrestadas para el tratamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .	67
Tabla 10. Análisis de varianza de un factor en plantas atacadas para el tratamiento de <i>Alternaria solani</i> .	68
Tabla 11. Prueba de Duncan en plantas atacadas para el tratamiento de <i>Alternaria solani</i> .	68
Tabla 12. Análisis de varianza de un factor en plantas contrarrestadas para el análisis de <i>Alternaria solani</i> .	69

Tabla 13. Prueba de Duncan en plantas contrarrestadas para el tratamiento de <i>Alternaria solani</i> .	69
Tabla 14. Longitud de las plántulas a tres tiempos en pruebas de invernadero	70
Tabla 15. Análisis de varianza para dos factores (tiempo y tratamiento) en el control de <i>Botrytis cinerea</i> .	71
Tabla 16. Prueba de Duncan según el tiempo en el control de <i>Botrytis cinerea</i> .	71
Tabla 17. Prueba de Duncan según el tratamiento en el control de <i>Botrytis cinerea</i> .	71
Tabla 18. Longitud de las plántulas a tres tiempos en pruebas de invernadero por efecto del filtrado del tiempo 56 de la cepa Bol <i>Trichoderma inhamatum</i> 12 QD-1 sobre <i>Alternaria solani</i> .	72
Tabla 19. Análisis de dos factores (tiempo y tratamiento) para el control de <i>Alternaria solani</i> .	72
Tabla 20. Prueba de Duncan según el tiempo en el control de <i>Alternaria solani</i> .	72
Tabla 21. Prueba de Duncan según el tratamiento en el control de <i>Alternaria solani</i> .	73
Tabla 22. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .	74
Tabla 23. Prueba de Duncan para peso fresco en el tratamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .	74
Tabla 24. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento de <i>Alternaria solani</i> .	75
Tabla 25. Prueba de Duncan para peso fresco en el tratamiento de <i>Alternaria solani</i> .	76
Tabla 26. Análisis de varianza de un factor (peso seco) para el tratamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .	77

Tabla 27. Prueba de Duncan para peso seco en el tratamiento de <i>Botrytis cinerea</i> .	77
Tabla 28. Análisis de varianza de un factor (peso seco) para el tratamiento de <i>Alternaria solani</i> .	78
Tabla 29. Prueba de Duncan para peso seco en el tratamiento de <i>Alternaria solani</i> .	79
Tabla 30. Recuperación de las fracciones de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1.	79
Tabla 31. Actividad antifúngica de las fracciones aisladas de <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12QD-1 contra <i>Botrytis cinerea</i> .	81
Tabla 32. Actividad antifúngica de las fracciones aisladas de <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12QD-1 contra <i>Alternaria solani</i> .	81
Tabla 33. Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> contra forma promastigote de <i>Leishmania</i> y epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> de las fracciones aisladas de la cepa <i>Trichoderma inhamatum</i> Bol 12 QD-1.	83

BIOCONTROLADOR EFFECT OF THE STRAIN *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 ON THE PHYTOPATHOGEN *Botrytis cinerea* CAUSE OF THE SPOT CHOCOLATE IN CULTURES OF HABA OF THE COMMUNITY OF CHIRAPACA

ABSTRACT

The present work is part of the "Developed Project of Microbial Biodiversity" in the IIFB, of the UMSA-Asdi/Sarec Program that is developed in joint form with the department of Environmental Biotechnology of the University of Lund. Our work consisted in evaluating the antifungal activity of the strain *Trichoderma inhamatum* Bol 12QD-1 against to strains of *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani*, phytopathogens causes of many diseases of economic interest and parasites like *Tripanosoma cruzi* and 3 strains of *Leishmania*. Use for it the technique of dilution in plate to demonstrate to the degree of antagonism of the strain *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 producer of antifungal substances forehead to the phytopathogens before mentioned, showing an effectiveness of 80 % 61 % respectively. With the purpose that the results in laboratory can reproduce at field level, the tests in conservatory with seven treatments and 10 repetitions were made respectively, orienting itself this way to the election of more efficient and fruitful strains like antagonistic as opposed to the phytopathogen *in situ*. I identify myself to treatment B+T and A+T, like but the best one, being observed a greater length and weight in plántulas of haba. Also the tests went to the obtaining of fractions responsible for the obtained biologic activity by means of chromatography in column, these fractions were isolated of ferments produced in conditions of cultures non - agitated of the strain *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1, identifying itself to the fraction yellow, responsible for the inhibiting activity of the phytopatogens (*Botrytis cinerea* and *Alternaria solani*) and the parasites (*Tripanosoma cruzi* and the 3 strains of *Leishmania*). Of equal way the field tests corroborated the inhibiting activity *in vitro* of the yellow fraction, as the treatment with better yield of case and weight in grain.

Finally the strain responsible for this activity, as much *in vitro* as in alive, was identified like *Trichoderma inhamatum*.

Keywords: Biologic activity, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1.

EFFECTO BIOCONTROLADOR DE LA CEPA *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 SOBRE EL FITOPATÓGENO *Botrytis cinerea* CAUSANTE DE LA MANCHA CHOCOLATE EN CULTIVOS DE HABA DE LA COMUNIDAD DE CHIRAPACA

RESUMEN

El presente trabajo es parte del “Proyecto de Biodiversidad Microbiana” desarrollado en el IIFB, del Programa UMSA-Asdi/Sarec que se desarrolla en forma conjunta con el departamento de Biotecnología Ambiental de la Universidad de Lund. El presente trabajo consistió en evaluar la actividad antagonica de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 frente a cepas de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*, fitopatógenos causantes de muchas enfermedades de interés económico y parásitos como *Tripanosoma cruzi* y 3 cepas de *Leishmania*. Se empleo para ello la técnica de dilución en placa para demostrar el grado de antagonismo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 productora de sustancias antifungicas frente a los fitopatógenos antes mencionados, mostrando una efectividad del 80 % y 61 % respectivamente.

Con la finalidad que los resultados en laboratorio puedan reproducirse a nivel de campo, se realizaron los ensayos en invernadero con siete tratamientos y 10 repeticiones respectivamente, orientándose de esta manera a la elección de cepas más eficientes y más prolíficas como antagonistas frente al fitopatógeno *in situ*. Se identifico al tratamiento B+T y A+T, como el mas benéfico, observándose una mayor longitud y peso en las plántulas de haba (*Vicia faba*).

Asimismo los ensayos se dirigieron a la obtención de sustancias responsables de la actividad biológica obtenida mediante cromatografía en columna, dichas fracciones fueron aisladas de fermentos producidos en condiciones no agitadas de cultivos de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1, identificándose a la fracción amarilla, responsable de la actividad inhibitoria de los fitopatógenos (*Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*) y los parásitos (*Tripanosoma cruzi* y las 3 cepas de *Leishmania*).

De igual manera las pruebas de campo corroboraron la actividad inhibitoria *in vitro* de la fracción amarilla, como el tratamiento con mejor rendimiento de vaina y peso en grano. Finalmente la cepa responsable de dicha actividad, tanto *in vitro* como *in vivo*, fue identificada molecularmente como *Trichoderma inhamatum*.

Palabras claves: Actividad biológica, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. Introducción

La micobiota del suelo tiene gran variedad de microorganismos, constituida por una mezcla microscópica formada de millones de bacterias, actinomicetes, hongos, protozoos, etc., por cada gramo de suelo (Ma de Lourdes, 1991), cada uno de los cuales cumplen un rol esencial en los procesos biogeoquímicos de la materia.

Existen muchos microorganismos antagónicos que están presentes naturalmente en los suelos de los campos de cultivo y ejercen cierto grado de control biológico sobre uno o muchos fitopatógenos. Sin embargo el hombre ha hecho intentos por aumentar la efectividad de los microorganismos antagónicos, ya sea introduciendo poblaciones nuevas y mas prolíficas de antagonistas como por ejemplo el hongo saprofito *Trichoderma* sp y muchos otros microorganismos que se encuentran actualmente en estudio.

La especies *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* son patógenos de distribución mundial que ocasionan perdidas importantes en la mayoría de las plantas perennes y anuales incluyendo casi todos los cultivos hortícolas que se desarrollan dentro o sobre el suelo no existiendo un fungicida efectivo contra esta enfermedad. Entre las enfermedades comúnmente causadas por estos hongos está la llamada mancha chocolatada de la hoja de haba, infectando cultivos de importancia económica tanto en Bolivia como en países de Latinoamérica y a nivel Mundial (Agrios, 1998).

Los mecanismos a través de las cuales los suelos inhiben el desarrollo de los diferentes patógenos no siempre son claros, pero pueden involucrar factores bióticos y/o abióticos e incluso variar de acuerdo al microorganismo. Sin embargo en la mayoría de los casos al parecer principalmente gracias a la presencia, en los suelos, de uno o varios microorganismos antagónicos al hongo, se evita que estos últimos alcance poblaciones suficientemente altas para causar enfermedades severas, utilizando diferentes mecanismos como la producción de antimicrobianos, competencia de nutrientes o parasitando directamente al hongo agresor (Agrios, 1996).

Por todo lo expuesto anteriormente el control biológico utilizando biocontroladores especialmente hongos filamentosos, que son productores de metabolitos biológicamente activos, y que constituyen hoy en día una alternativa que podría sustituir el control químico que además de su elevado costo, trae como consecuencia el desarrollo de mecanismos de resistencia en el hongo patógeno y problemas de contaminación ambiental y toxicidad (Escande *et al.*, 1999).

1.2 Antecedentes

1.2.1 Antecedentes Nacionales

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas desde el año 2000, inició con una línea de trabajo en la producción de microorganismos biocontroladores con actividad biológica inhibitoria de fitopatógenos de importancia tanto agrícola como económica en las especies de haba (*Vicia faba*) y de papa (*Solanum tuberosum*), así por ejemplo Peláez (2002), reporta el antagonismo microbiano para *Botrytis cinerea* causante de la mancha chocolatada de *Vicia faba* y *Alternaria solani* causante del tizón temprano de la papa utilizando dos microorganismos antagónicos *Fusarium* sp. y *Verticillium* sp. Donde *Verticillium* sp. resulto mas eficaz inhibiendo el crecimiento *in vitro* tanto de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*.

Existen instituciones en Bolivia como ser PROINPA, PROBIOMA, PROBIOTEC que ofrecen al mercado agroindustrial productos basados en el micoparasitismo, los cuales son utilizados para combatir plagas y enfermedades que atacan a los sembradíos. Desde 1992, PROINPA en Bolivia ha desarrollado estrategias para el control químico del tizón en cultivos susceptibles y resistentes, que toman en cuenta para la toma de decisiones en las aplicaciones, las condiciones epidemiológicas locales, tipos de fungicidas disponibles en el mercado local y sus características, la oportunidad apropiada para su uso considerando su interacción con el hospedante y su acción en las fases del ciclo biológico del patógeno, así como la idiosincrasia del agricultor andino de aquellas zonas en las que el tizón los ha llevado a una cultura de evasión del problema. Esta fundación ha generado varias propuestas para el Manejo Integrado de Plagas de la papa, a fin de contribuir para que los agricultores puedan elevar sus niveles de producción y consecuentemente mejorar su nivel de vida.

En el caso de la papa, PROBIOMA ya tiene probados biorreguladores nativos (hongos entomopatógenos, micoparásitos y nematodos entomopatógenos), que son capaces de controlar biológicamente las plagas. Los biorreguladores, que son inocuos para la salud del hombre y los animales, están siendo aplicados masivamente por los agricultores de varias zonas de Santa Cruz y en varias regiones de Bolivia. Asimismo, en las pruebas de eficiencia de campo los resultados alcanzados de acuerdo a las formulas y evaluación de las aplicaciones realizadas, demostraron una eficiencia del 75 al 95%.

A pesar que esta iniciativa significa para Bolivia un paso muy importante en el control de fitopatógenos, la difusión ha sido escasa pese a la gran importancia que tiene, por significar una real alternativa al alto grado de dependencia a insumos externos, tales como cultivos transgénicos o el uso indiscriminado de químicos, el cual traerá aparejado graves consecuencias para los valiosos recursos genéticos de Bolivia.

1.2.2 Antecedentes Internacionales

En la actualidad se cuenta con literatura relacionada al control biológico de fitopatógenos utilizando microorganismos seleccionados.

Estudios realizados por Olivos (1989) en Perú, reporta el antagonismo microbiano para *Sclerotium rolfsii* causante de la pudrición basal de *Hordeum vulgare* utilizando 4 microorganismos antagónicos (*Bacillus* sp, *Gliocadium roseum*, *G rimosus* y *Trichoderma viridae*) en asociación con compuestos químicos para la reducción del fitopatógeno. Donde *Trichoderma viridae* y *Bacillus subtilis* resultaron más eficaces inhibiendo la formación de esclerócios sin afectar el material vegetal frente al testigo sano.

Asimismo Rivera (1995), describe a *Trichoderma viridae* y fungicidas sistémicos en el control de *Sclerotium rolfsii* en maní bajo condiciones de invernadero. El trabajo se realiza con la aplicación simultanea del biocontrolador y un compuesto químico (Mancozeb a una concentración de 100 uL/mL) para la reducción de la enfermedad donde el tratamiento con fungicida y *Trichoderma viridae* fue efectivo contra la enfermedad siendo afectadas solo el 12 % de las plantas frente al tratamiento control.

Alippi *et al.*, (1990) reporta el antagonismo de hongos fitopatógenos y saprobios en suelos hortícolas. Describe dos cepas (*Trichoderma harzianum* y *T. koningii*) con capacidad antagonista frente a fitopatógenos (*Fusarium solani*, *F.oxysporium* y *Alternaria solani*) donde las dos especies muestran un fuerte antagonismo para *Alternaria solani* y *Fusarium solani*. Este trabajo fue desarrollado en la Republica de Argentina.

Bettiol *et al.*, (1996) en Brasil trabajando en plantas de interés comercial, seleccionó y desarrollo antagonistas de patógenos de plantas entre ellos *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* y *Gliocadium roseum*.

Brizuela *et al.*, (1998) describe a los Basidiomicetos como una nueva fuente de metabolitos secundarios. Y de esta forma producir una gran variedad de moléculas en medio naturales y sintéticas.

Durman *et al.*, (1999), evalúan a *Trichoderma* spp. como antagonista de *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Alternari solani* *in vitro* como biocontrolador en plantas de tomate. Señalando que el agregado al suelo de cepas de *Trichoderma* spp. redujo significativamente al fitopatógeno disminuyendo la supervivencia y el crecimiento de las plantas la producción de enzimas degradativas esta directamente vinculada con el efecto antagonico. Asimismo Oberti *et al.*, (1999) quien describe el efecto de la aplicación de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia de *Sclerotinia sclerotiorum* en tres cultivares de lechuga producidas en forma orgánica. Observo que *Trichoderma harzianum* es un biocontrolador sobre *Sclerotium sclerotium* causante de la podredumbre en lechuga, considerando que la densidad y la variedad es el factor determinante sobre la incidencia de la podredumbre. La evaluación de la actividad biológica fue llevada a cabo en Argentina.

Bajsa *et al.*, (1999), reporta a *Pseudomonas fluorescens* productora de múltiples antimicrobianos. Define que *P. Fluoresecens* protege eficazmente a *Lotus corniculatus* del ahogamiento (en inglés, *damping off*) causado por *Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani*, y no interfiere en la cinética de la ondulación del simbionte ni la capacidad promotora del crecimiento. Este trabajo fue llevado cabo en Uruguay.

Trabajos realizados de aplicación del control biológico en Argentina son reportados por Escande *et al.*, (1999) quienes evaluaron a *Gliocadium* spp. y *Trichoderma* spp. en el biocontrol de la pudrición húmeda del capitulo de girasol causada por *Sclerotinia sclerotium*. Estas dos cepas aisladas de suelos se prepararon en suspensiones luego asperjados a cada capitulo así como las ascosporas de *Sclerotinia sclerotium*. Donde *Trichoderma* sp. redujo entre 41 y 76% la intensidad de la enfermedad seguido de *Gliocadium roseum*.

Green *et al.*, (1999), describe a la supresión del agente biocontrolador *Trichoderma harzianum* por micelio de hongos arbusculares micorrizales *Glomus intrraradices* en raíz libre de suelo. Donde *Trichoderma harzianum* es un buen biocontrolador de hongos patógenos y no afecta a los hongos micorrizales arbusculares.

Alcaraz *et al.*, (1999), reporta a *Bacillus* spp. *in vitro* como biocontrolador de *Fusarium* sp. Determinando la efectividad de *Bacillus* sp., siendo efectivas y provocando el deterioro morfológico del micelio y estructuras reproductivas disminuyendo significativamente el desarrollo miceliar de *Fusarium* sp.

Wright *et al.*, (1999), describe el uso de agentes biológicos y de enmiendas orgánicas para el control de fitopatógenos del suelo en cultivos hortícolas. Se aislaron cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Trichoderma* spp. de la rizosfera evaluando el antagonismo frente a tres fitopatógenos (*Fusarium oxysporium*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotium*) demostrándose hacer formulaciones en almácigos *Pseudomonas fluorescens* se halla en etapa inicial de investigación.

En España Zchultz *et al.*, (2000)., reporta la mejora de cepas de *Trichoderma* spp. para su empleo como biofungicida. Describiendo el aumento en la capacidad para degradar la pared celular de los hongos fitopatógenos. Mediante la transformación con genes para quitinazas y gluconasas se obtuvieron cepas con actividad enzimática superior al silvestre. Donde se recomienda hacer las pruebas en invernadero y en campo.

Higgs *et al.*, (2001), describe un rápido método para estimar la presencia de metabolitos secundarios en extractos microbianos. Describen los métodos de separación en

condiciones de cultivo, crecimiento y fermentación promoviendo producción de metabolitos secundarios trabajo de investigación llevada a cabo en India.

1.3 Justificación

El haba (*Vicia faba*) y la papa (*Solanum tuberosum*) se constituyen en dos cultivos de importancia económica para Bolivia, anualmente el consumo nacional de haba fresca supera las 35.000 t y de la papa 550.000. Ambos cultivos son afectados por plagas, principalmente por hongos fitopatógenos, como *Botrytis cinerea* que afecta a hojas de haba en precosecha y la *Alternaria solani* que afecta a la papa en precosecha.

Considerando el uso indiscriminado de agroquímicos (pesticidas, fertilizantes) que contribuyen a la acumulación de residuos tóxicos en los alimentos y en el ambiente con serias consecuencias para la salud humana el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B), viene trabajando hace cuatro años, en la obtención de medios de control biológico, realizando estudios en el aislamiento de hongos fitopatógenos y el establecimiento de biocontroladores mas óptimos y con amplio espectro sobre los fitopatógenos que afectan cultivos agrícolas de mayor importancia económica.

El presente trabajo de investigación tiene el propósito de evaluar *in vitro* sobrenadantes de cultivos fúngicos obtenidos en cultivos batch estacionarios, comparar y evaluar su capacidad biocontroladora en cultivos de haba establecidos a nivel de invernadero y de campo.

La obtención de metabolitos secundarios en estos cultivos estuvieron basados en ensayos preliminares de selección de hongos biocontroladores del crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*. La aplicación de sobrenadantes de cultivos fúngicos con actividad biológica controladora de fitopatógenos, es una alternativa al uso indiscriminado de pesticidas químicos. De esta manera se reduciría la contaminación ambiental, posibles efectos tóxicos en los consumidores finales y disminución de costos en la agroindustria.

CARACTERÍSTICAS BOTÁNICO PRODUCTIVAS DE LA PLANTA DE HABA

2.1 Características Generales de la Planta de Haba

Es una planta herbácea, anual, de porte erecto, de tallos erguidos y que puede alcanzar 1,6 m. Son hortalizas resistentes, se cultivan especialmente en zonas frías, pero en las zonas templadas también se pueden cultivar durante todo el año. Se consume en forma fresca como legumbre o en grano seco como menestra, asimismo posee un alto contenido de vitaminas, carbohidratos y proteínas (Agrios, 1998).

De acuerdo a la descripción botánica de la *Vicia faba* presenta las siguientes variedades botánicas minor, equina y mayor que son las que se cultivan en mayor cantidad (French, 1988).

- Nombre científico y familia: *Vicia faba* L. *Fabaceae*. Papilionáceas
- Nombre común: haba, habichuela

El haba pertenece al Orden *Rosales*, familia *Fabaceae*, a la subfamilia *Papilionoides*, a la tribu *Viceas*, al género *Vicia* a la especie *V. faba* (Agrios, 1998).

Requiere de climas fríos y secos, requiere temperaturas que oscilan entre 12 y 17°C, con humedad relativa moderada y necesidades hídricas de 500-800 mm/año. Se adapta a las condiciones de las zonas alto-andinas 2.500 a 3.700 m.s.n.m es tolerante a las heladas, pudiendo soportar en las primeras etapas de su desarrollo temperaturas bajas de -5°C, pero durante la floración la temperatura debe ser de 10 °C aproximadamente. No exigentes en suelos, adaptados a distintos tipos de suelos de pH 6,0-7,5; prefieren suelos profundos, bien drenados y textura franco arenosa.

Ocasionalmente se consume la vaina en estado muy inmaduro. La leguminosa de menor calidad se emplea en alimentación animal (Ramírez, 1986).

Sarmiento *et al.*, (1999), menciona que el ciclo vegetativo del haba, fluctúa de 5 a 6 meses en variedades precoces y de 6 a 7 meses en las tardías el mismo autor divide al ciclo en las siguientes etapas fenológicas.

- 1) Germinación y plántula
- 2) Macollamiento y crecimiento vegetativo
- 3) Floración y fructificación
- 4) Maduración y cosecha

2.2 Importancia del Cultivo de Haba en Bolivia

El haba por sus cualidades nutritivas del grano con alto contenido proteico (24%), su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y su tolerancia a bajas temperaturas, se constituye en una especie importante para los alimentación como fuente de proteína barata, es una de las pocas leguminosas de grano adaptadas a las zonas altas, que sufre frecuentes heladas y los valles de la zona andina de Bolivia. Asimismo es la segunda especie, después de la papa, que genera ingresos económicos por su comercialización en vaina o de grano seco, encontrándose a nivel nacional con el 85% de la producción en el altiplano Boliviano (Tabla 1).

Tabla 1. Superficie, rendimiento y producción para diferentes cultivos en Bolivia durante 1999

CULTIVO	SUPERFICIE ha	RENDIMIENTO Kg/ha	PRODUCCIÓN tm
Soya	316.708	2.242	709.892
Papa	133.671	4.728	632.041
Trigo	112.088	760	85.236
Caña de azúcar	80.790	42.697	4.449.525
Quinoa	38.196	510	19.405
Yuca	33.027	8.869	292.921
Haba	26.230	1.462	38.359
Café	23.447	820	19.216

Fuente: INE 2004

La superficie cultivada de haba en Bolivia supera las 40.000 ha. Con una producción de 42600 t, de las cuales, un porcentaje está destinado al autoconsumo, y los excedentes son comercializados en los mercados locales y externos.

Actualmente el consumo nacional de haba fresca supera las 38.000 t, siendo consumida en mas del 90% de los hogares en los valles (Cochabamba) y el altiplano (La Paz), en la zona tropical del departamento de Santa Cruz lo consumen en mas del 75% de las familias. El consumo per cápita en el altiplano de La Paz es de 17,4 Kg/persona·año, siendo menor en la zona tropical (Santa Cruz) con 6,12 Kg/persona·año.

En los últimos años el grano de haba se ha convertido en un rubro de exportación principalmente a los mercados del Asia y Europa y existe la posibilidad de comercializar en vaina al mercado norteamericano. En el país se dedican al cultivo de haba aproximadamente 150.000 familias del altiplano.

2.3 Consecuencias en la Producción de Haba en Bolivia debido a la Infección por Fitopatógenos

Las reducciones en la producción y la superficie cultivada de haba se deben principalmente a la alta incidencia de parásitos que limitan la producción, desmejoran la calidad, degeneran el material e inducen a la descalificación comercial del producto ocasionando considerables pérdidas económicas al productor y consecuentemente disminuyendo su cultivo. Las enfermedades causadas por hongos son degenerativas y causan reducciones del 30% y en algunos casos pueden llegar a anular la producción.

El programa de Leguminosas de Grano del IBTA ha identificado que en el haba las principales enfermedades constituyen las virosis y las fúngicas tales como la mancha chocolatada (*Botrytis cinerea* y *fabae*), alternariosis (*Alternaria alternata*), roya (*Uromyces fabae*) y pudrición radicular (*Fusarium spp*).

En los últimos 8 años tanto la superficie cultivada como la producción de haba fresca, sufrieron reducciones significativas desde 40.000 ha y 56.000 t en 1987 hasta 26.230 ha y 38.359 t en 1994. Sin embargo, el rendimiento ha mostrado una tendencia relativamente constante.

La reducción tanto de la superficie cultivada de la producción ocurrió en las zonas altas de los departamentos de Potosí, La Paz, Cochabamba, Oruro y Tarija debido a una disminución de los rendimientos por unidad de superficie y la menor rentabilidad por el mayor empleo de plaguicidas (INE, 1999).

2.4 Características Generales de la Planta de Papa

Según Huamán *et al.*, (1996), la papa es una planta herbácea, anual; el tallo aéreo es angulosos, erecto de color verdoso o rojizo – violáceo a causa de un pigmento llamado antocianina. Los cultivares de papa se diferencian por muchos índices: la estructura de las hojas, el color de la flor, por el retoño y del tubérculo, etc.

De acuerdo a la descripción botánica de *Solanum tuberosum* presenta la siguiente clasificación taxonómica.

- Nombre científico y familia: *Solanum tuberosum*, *Solanaceae*.

- Nombre común: papa.

Alvarado *et al.* (2000) indica que el desarrollo del follaje es más rápido a temperaturas altas que a temperaturas bajas, la temperatura óptima para la fotosíntesis parece estar entre 10°C y 20°C. Huaman (1986); Cahuan *et al.* (1993), indica que las raíces se pueden desarrollar a partir de una semilla o de un tubérculo.

2.5 Importancia del Cultivo de Papa en Bolivia

Bolivia ha heredado de la cultura Tihuanacota, la domesticación de una planta cuyos frutos comestibles son tubérculos de alto valor alimenticio y delicioso sabor.

Hace al menos 8.000 años, que la papa se ha constituido en el alimento básico y producto agrícola tradicional más importante del altiplano. Actualmente es uno de los principales sustentos del mundo, ya que provee parte de los requerimientos y nutrientes esenciales para el cuerpo humano (FEDEPAPA, 1990).

Se constituye en la dicotiledónea más importante en Bolivia por ser uno de los cultivos con mayor significación económica, agrícola y social e histórica, considerándose la planta nacional (Leyenda del Museo Nacional de Arqueología, 1995). Actualmente es la base de la alimentación de la población rural y uno de los alimentos de primera necesidad para el productor urbano. El consumo per cápita anual es de 100 kg (FEDEPAPA, 1989).

La mayor variabilidad genética de especies se concentra en el área de la mesetas peruano-boliviana, y de las 183 especies de este género el 74,3% es diploide, el 3,8% triploide, el 14,8% es tetraploide, el 1,6% es pentaploide y el 5,5% es hexaploide.

La superficie destinada para el cultivo en el año 1999 en Bolivia fue de 126.300ha y el rendimiento promedio alcanza 5,9 t/ha (MACA, 1999). Este rendimiento es el quinto en América Latina, sin embargo va disminuyendo por la falta de tecnología adecuada que permita solucionar los problemas fitosanitarios que se presentan durante los cultivos (INE, 1999).

Dentro del territorio nacional ocupa el primer lugar en producción dentro los cultivos que pertenecen al altiplano Boliviano (Tabla 2).

Tabla 2. Superficie, rendimiento y producción de papa por departamento durante 2004

DEPARTAMENTO	SUPERFICIE has	RENDIMIENTO kg/ha	PRODUCCIÓN t
La Paz	36.251	4.312	156.309
Cochabamba	25.000	5.504	137.593
Potosí	31.500	4.223	133.083
Tarija	7.300	6.402	46.733
Santa Cruz	3.684	990	36.472
Beni	60	4.417	265
Pando	11	3.818	42
Chuquisaca	20.112	4.453	89.567
Oruro	9.753	3.283	32.022

Fuente: INE (2004)

2.6 Consecuencias en la Producción de Papa en Bolivia debido a la Infestación por Fitopatógenos

En los últimos años el cultivo de papa se ha visto afectado por la enfermedad marchites y manchas necróticas, la cual es ocasionada por un fitopatógeno, que disminuye la calidad

de los tubérculos al inducir la acumulación de metabolitos ocasionándoles un manchado interno que los hace inadecuados para la industria.

El incremento de la enfermedad es considerable ya que en 1993 se obtuvieron cosechas con 305 de tubérculos dañados y de 905 en 1995 (Fundación PROINPA *et al.*, 2002).

La producción de papa en la región andina esta fuertemente influenciada por numerosos factores ambientales. Su desarrollo puede estar afectado por la falta de agua, nutrientes del suelo y por la presencia de organismos que pueden afectar al cultivo disminuyendo el rendimiento y la calidad de los tubérculos.

El tizón temprano es una enfermedad causada por el hongo *Alternaria solani* que en Bolivia afecta a unas 20.000 ha de papa, una gran parte dedicada a la producción de semilla.

PATÓGENOS QUE ATACAN LOS CULTIVOS DE HABA Y PAPA

3.1 Patógenos que Atacan los Cultivos de Haba

Existen muchos patógenos que afectan a estos cultivos siendo la sintomatología diferente en cada una dependiendo de las distintas enfermedades, aún cuando pueden ser de un determinado patógeno, el diagnóstico preciso requiere de métodos de identificación de laboratorio (microscópica, test bioquímico, test serológicos, pruebas en plantas). En el altiplano se han reportado los patógenos que se mencionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales daños y síntomas causados por algunos insectos y patógenos en cultivos de haba en el altiplano boliviano

Enfermedad	Patógeno	Daños	Síntomas
Yana K'urus	<i>Myzus persicae</i>	Tallos, vainas	Perforaciones
Gusanito	<i>Liriomyza</i> sp.	Tallos y hojas	Manchas blancas
Barrenador	<i>Elasmopalpus lignosellus</i>	Tallo, vainas	Manchas y orificios
Moho gris	<i>Botrytis cinerea</i>	Hojas, tallos	Manchas marrones
Antracnosis	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Hojas, flores y vainas	Manchas negras
Roya	<i>Uromyces fabae</i>	Hojas	Pústulas

Fuente: Manual para el uso de plaguicidas, 1998

3.2 Patógenos que Atacan los cultivos de Papa

Existe una multiplicidad de enfermedades atacando al cultivo de papa, patógenos que por lo general están presentes en el suelo o bien pueden ser reportados por el tubérculo-semilla con enfermedad.

Las condiciones climáticas de alta temperatura y falta de riego favorecen el desarrollo de vectores y enfermedades, por lo cual los controles químicos deben ser más intensivos en áreas de la zona central y norte chico que hacia el sur boliviano.

Los principales patógenos presentes en los cultivos de papa que se siembran en el Altiplano Boliviano se mencionan en la Tabla 4.

Tabla 4. Principales daños y síntomas causados por algunos patógenos en cultivos de papa en el altiplano boliviano

Enfermedad	Patógeno	Daños	Síntomas
Tizón tardío	<i>Phytophthora infestans</i>	Tallos y hojas	Manchas café oscuras
Tizón temprano	<i>Alternaria solani</i>	Hojas	Manchas con anillos concéntricos
Piqui piquis	<i>Premnotrypes vorax</i>	Tallos, tubérculos	Perforaciones en tubérculo

Fuente: Manual fitosanitario de manejo de plagas 1998

3.3 Hongos Fitopatógenos

Se llama fitopatógeno, a todo aquel biológico que produce enfermedad en las plantas. Por lo general, la mayoría de estas enfermedades están causadas por hongos, las cuales han sido descritas desde la antigüedad.

3.3.1 Moho Gris (*Botrytis cinerea*)

- Clase: *Deuteromicetes*
- Orden: *Moniliales*
- Género: *Botrytis*
- Nombre común: Moho gris
- Nombre científico: *Botrytis cinerea*
- Hospedantes: Lechuga, frutilla, haba, uva, alcachofa, frijol, remolacha, col, zanahoria, pepino y berenjena, la pudrición del extremo de la punta de los plátanos, lechuga, pimiento, calabaza, tomate, jacinto, tulipán, lirio, rosal.
- Distribución geográfica: Grecia, Finlandia, España, Colombia y Bolivia (Simon, 1987).

3.3.2 Síntomas y Ciclo de la Enfermedad

El patógeno produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro. Algunas especies producen a veces una fase perfecta con esclerocios, en la que las ascosporas se forman en un apotecio. *Botrytis* inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Al parecer, este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios del tamaño de esas semillas o sobre restos de plantas a los que ha infectado.

Las etapas de invernación también se propagan mediante cualquier factor que mueva el suelo o los restos vegetales que pudieran portar esclerocios o micelio del hongo. Este último requiere un clima húmedo y moderadamente frío (18 a 23°C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germine sus esporas y para que produzca la infección. El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosecha que se han mantenido almacenada durante largos periodos, aun cuando las temperaturas estén entre 0 y 10°C. Las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero lo hacen en tejidos de la planta a través de heridas o después de que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre los pétalos de flores senescentes, follaje moribundo de las plantas, escamas de bulbos muertos, etc.

El hongo infecta los pétalos de la flor cuando comienza a envejecer; el micelio penetra e invade el resto de la inflorescencia, posteriormente avanza hacia el pedicelo el cual se pudre ocasionando el colgamiento de las yemas y flores; produce numerosos conidios que reinician el proceso de infección. *Botrytis* inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio que se desarrolla en tejido vegetal en descomposición. Para el desarrollo del micelio, la esporulación, liberación de las esporas y proceso de infección se requiere temperaturas de 18°C a 23°C. *Botrytis cinerea* puede penetrar al hospedante mecánicamente o bajo la acción de enzimas o toxinas, dependiendo la etapa de

penetración. Dogman y Flentje (1970), mencionados por Chet (1980), reportaron esta infección, que puede ser sobre las hojas donde el hongo presenta clavijas, penetrando la epidermis del tejido hospedero.

En algunos casos las hifas se aplanan y funcionan como apresorios antes de la penetración. La infección por medio de clavijas aparentemente penetra las células mecánicamente como descrito por varios estudiosos. Sin embargo Flentje (1957), mostró que las células parenquimatosas secretan materiales mucilaginosos, permitiendo así adherirse a los tejidos del hospedante (Chet, 1980).

El papel de las enzimas en la penetración es importante. *Alternaria solani* produce enzimas quitinolíticos, el cual puede degradar la cutícula. Pectinasas y celulasas pueden producir fusión durante la penetración, presumiblemente después de que haya penetrado y destruido la cutícula.

Hasta el momento no se pudo identificar las enzimas que actúan durante la penetración. Pero posiblemente las propectinasas, celulasas son importantes durante la degradación y muerte de los tejidos del hospedante.

Siguiendo la penetración inicial, el mecanismo patogénico de *Alternaria solani* son varios e inadecuadamente explorados con los diferentes hospederos. Pero generalmente después de una invasión intercelular sigue una invasión intracelular (Krupa y Donmergues, 1981).

3.3.3 Tizón Temprano de la Papa (*Alternaria solani*)

- Clase: *Deuteromicetes*
- Orden: *Moniliales*
- Familia: *Dermatiaceae*
- Género: *Alternaria*
- Especie: *A.solani*
- Nombre común: Tizón temprano
- Nombre científico: *Alternaria solani* (Ell y Mart.) Jones y Grout

- Hospedantes: Tomate, papa, berenjena, chile verde, chile picante, haba y otras plantas de la familia Solanáceae.
- Distribución geográfica: En todo el mundo

3.3.4 Síntomas y Ciclo de la Enfermedad

Alternaria solani es el hongo causante de la enfermedad conocida con el nombre de Tizón temprano. Este patógeno empieza a atacar por las hojas bajas iniciándose los síntomas como pequeñas lesiones necróticas más o menos circulares, de color gris oscuros, ligeramente hundido donde se aprecian algunos anillos concéntricos. El aro que rodea a la lesión necrótica, se torna clorótica y puede abarcar toda el área de la hoja. Las lesiones necróticas se observan también en el tallo. En el caso de fuerte ataque, produce defoliación de la planta iniciándose desde la base. El daño en las hojas se manifiesta más intensamente cuando la planta sufre trastornos fisiológicos severos, ataque de plagas, sequía, exceso de humedad, etc. En tubérculos de papa se presentan lesiones irregulares hundidas y el tejido lesionado se torna marrón oscuro y totalmente seco.

Los folios de la parte superior de la planta presentan algo de enrollamiento y antocianescencia rojiza en el borde de su cara interior. Existe proliferación de tallos y estolones aéreos. La planta tiene una floración reducida y existe una proliferación de las raíces y tubérculos. Los tubérculos son muy pequeños mostrando un color rojizo uniforme.

El hongo puede sobrevivir en el suelo, en residuos de cultivos infestados y malezas. El hongo puede sobrevivir en semillas y este es dispersado con la ayuda del viento, agua insectos, trabajadores y maquinaria agrícola. Las esporas que aterrizan en las plantas, germinan e infectan las hojas cuando estas están húmedas. Las esporas pueden penetrar las hojas, tallos o frutos. El hongo es mas activo cuando ocurren temperaturas moderadas o calientes y el ambiente esta húmedo. Esta enfermedad tiene mayor problema en la época lluviosa. El tizón temprano es mas severo cuando las plantas están estresadas por mucho fructificación, ataque de nematodos, o deficiencia de nitrógeno.

CONTROL BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN CULTIVOS DE HABA Y PAPA

4.1 Control Biológico

Baker y Cook (Agrios, 1998) definen el control biológico como la reducción de la densidad del inoculo o activad productora de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o latente, por uno o más organismos antagónicos, en forma natural o por manejo del habitante, hospedante o de los propios microorganismos. En un sentido amplio y según la definición de los mismos autores, el control biológico involucraría todas aquellas prácticas tendientes a disminuir las incidencias de indeseables excluyendo el control químico. El control biológico en un sentido más restringido de hongos, implica el uso de microorganismos antagonistas que interfieren en la supervivencia de patógenos o en el desarrollo de actividades determinantes de enfermedad o en el control de plantas o malezas indeseables

4.2 Los hongos como Agentes de Biocontrol

El control de hongos fitopatógenos utilizando microorganismos antagónicos, como se ha definido en su forma clásica se basa en la acción antifungosa de bacterias, hongos y actinomicetos, etc. Proveniente del suelo conocidos con el nombre de hiperparásitos o micoparásitos. Ej: *Trichoderma* spp. en *S. rolfsii*; *S. cepivorum*, *Verticillium dahliae* y *R. solani* (Ahmad *et al.*, 1987).

En el control biológico, se utiliza las esporas o los filtrados de cultivos que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus hospederos o por micoparásitos matando las estructura invadidas directamente, reduciendo de esta manera la concentración de espora o de la densidad poblacional, y por ende el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Elad y Katan, 1980).

El control biológico ofrece ventajas por su bajo costo, no contamina el ambiente, y no presenta problemas de residuos, pero los resultados disponibles han sido obtenidos mayormente *in vitro* y bajo condiciones controladas. No obstante se van incrementando los trabajos de investigación en los diferentes países del mundo. Actualmente el control biológico constituye en uno de los grandes retos de nuestros tiempos (FAO, 1990).

En el control de enfermedades causada por hongos, como este trabajo esta iniciando la posibilidad de su empleo mediante estudios *in vitro* y en el campo para el control de *Botrytis cinera* y *Alternaria solani* causante de la mancha chocolatada del haba, utilizando la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1. Este aporte es uno de los pocos en nuestro país.

4.3 Microorganismos Antagónicos

EL mecanismo por el que los microorganismos antagónicos afectan a las poblaciones de patógenos no siempre es claro, pero en general se atribuyen a uno de los cuatro efectos:

- a) Parasitismo directo y muerte del patógeno
- b) Competencia con el patógeno por el alimento
- c) Efectos tóxicos directos sobre el patógeno por medio de sustancias antibióticas liberadas por el antagonista
- d) Efectos tóxicos indirectos sobre el patógeno por sustancias volátiles como el etileno, liberadas por las actividades metabólicas del organismo antagonista.

Entre los hongos antagonistas mas estudiados se tiene *Trichoderma* spp. Que ejerce un biocontrol sobre muchas especies de hongos fitopatógenos como *Sclerotium roldsii*, *S. Cepivorum*, *Verticillium dahaliae*, *Rizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* y muchos otros (Hadar *et al.*, 1979). Dentro de los hongos micoparásitos, se encuentra *Trichoderma harzianum*, que parasita el micelio de *Clerotium*, inhibe el crecimiento de muchos hongos, como *Pythium*, *Fusarium*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*, y reduce la magnitud de las enfermedades causadas por la mayoría de estos patógenos. Otros hongos micoparásitos comunes son *Lateisaria arvalis*, un micoparásito y antagonista de *Alternaria solani*, *Rhizoctonia* y *Pythium*; así mismo, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Gliocadium virens* y *Coniothorium minitans* son parásitos y antagonistas destructores de

Sclerotinia sclerotium y controla eficazmente varias de las enfermedades que causa *Sclerotinia* (Fravel, 1988).

Se ha demostrado también que muchos hongos antagonistas inhiben a numerosos hongos patógenos de partes aéreas de las plantas. Por ejemplo se ha observado que *Chatomium* sp, inhibe la producción de ascosporas y conidios de *Venturia inaequalis* en las hojas ya desprendidas y las que están en desarrollo. *Tilletiopsis* parásita al hongo de la cenilla del peño, etc. Además de los hongos, se ha demostrado que las bacterias del genero *Streptomyces* y *Pseudomonas* parasitan o inhiben a los hongos patógenos *Psytium* sp. y *Gaeumannomyces tritici*, el nematodo micófago *Aphelencus avenae* parasita a *Alternaria solani* y *Fusarium*.

Los nematodos fitopatógenos también son parasitados por otros microorganismos por ejemplo el nematodo agallador de la raíz, *Meloidogyne* sp., es parasitado por el hongo *Dactylella oviparasitica*. *Melodogyne javanica* también es parasitado por la bacteria *Bacillus penetrans* (Agrios, 1998).

4.3.1 *Trichoderma* spp

Pertenece al orden *Hyphales* (*Moniliales*) y se caracteriza por presentar conidioforos hialinos, muchas veces blanquecinos, no verticilados, phialides simples o en grupos; conidias (*Phialosporas*) hialinas, unicelulares, ovoide que yace en pequeños racimos terminales; se les reconoce fácilmente por su rápido crecimiento y por el color verde de las conidias, son saprofitos muy comunes sobre el suelo o mamadera (Barnett *et al.*, 1972). EL genero *Trichoderma* spp. comprende un conjunto de especies sin fase asexual evidente. Presenta la siguiente clasificación taxonómica (Agrios, 1996).

Sub-Dvision: *Deuteromycotina*

Clase: *Hyphomycetes*

Orden: *Hyphales* (*Moniliales*)

Genero: *Trichoderma* (es un antagonista de muchos hongos fitopatógenos)

Trichoderma sp.

4.4 Medios de Control Físico y Químico de Fitopatógenos

Como medios de control físico más utilizado está el acolchamiento donde se colocan cubiertas de polietileno transparentes o plásticos fotodegradables sobre el suelo húmedo durante los días calientes de verano, la temperatura que prevalece en los primeros 5 cm en la parte superficial del suelo puede elevarse hasta 25°C, comparando con un máximo de 37°C en suelos que carecen de acolchado. Esto se mantiene cuando el calentamiento es generado por el sol conocido con el nombre de solarización, el cual inactiva a muchos patógenos que habitan en el suelo. Se ha reportado que una solarización de 20 días, se obtiene una mortalidad de los esclerotes de 80% de 5 a 20 cm de profundidad (Mont, 1993).

Un cierto tipo de control, surge después de practicar la rotación de cultivos durante un tiempo suficiente (Agrios, 1996).

Cuando el hongo va en la semilla, depende del uso de semillas libres de la enfermedad o que hayan sido tratadas con agua caliente y compuestos químicos. El humedecimiento del suelo con PCBN (Pentacloronitrobenceno) ayuda a disminuir el ahogamiento de los almácigos en invernaderos. Entre los compuestos químicos que inhiben el crecimiento micelial se tiene el Naftaleno, Derivados del Cloro y Bromo. El Benceno y sus derivados. El Vapam, Campogram, Calixin 75, Capatafol y Benomil (Lewis y Papavizas, 1987). Cooper (1991) citado por Akem y Dashiell 1991 reportan el PCNB en cantidades de 6,8 – 13 Kg/ha son efectivos.

4.4.1 *Botrytis cinerea*

La aplicación de atmósferas modificadas en el embalaje, previo al embarque, con 10 a 15% de bióxido de carbono reduce el crecimiento de *Botrytis cinerea* y la tasa de respiración y por lo tanto, extiende la vida poscosecha de los cultivos. El método más común para la aplicación es el uso de una película plástica para cubrir completamente el palet (pallet) o carga unitarizada.

En Bolivia se utilizan fungicidas de origen químico tales como Mancozeb, Merpafolagua, con un intervalo de aplicación de 10 a 15 días.

4.4.2 *Alternaria solani*

La mejor manera de manejar esta enfermedad es mediante un control preventivo porque una vez el tizón temprano se establece en el cultivo, es muy difícil su control. Las estrategias de control se basan en: temporada de siembra, lugar del cultivo, rompevientos, irrigación, calidad de semilla, plántulas, fertilización, destrucción de rastrojos y rotación.

Los agricultores inspeccionan el cultivo dos veces por semana buscando plantas con los síntomas de la enfermedad antes de iniciar cualquier aplicación de fungicidas. En Bolivia los fungicidas más utilizados son: Agrozeb-PM80, Antracol-PM70, Championb- PM77, Dithane-PM80, Fungitox-500-SC, Impac-12,5-SC y Sportak-45PM en dosis generalmente de 50g/L de agua con un intervalo de aplicación de 7 a 10 días.

PRODUCCIÓN DE BIOCONTROLADORES

Si consideramos al suelo como un ecosistema vivo y funcional, se puede formar un ecosistema en el cual los microorganismos del suelo existan en relación simbiótica, eficiente y funcional controlándola biológicamente para prevenir y combatir contra depredadores que atacan constantemente a la planta, en respuesta a la creciente necesidad de reducir el uso de agroquímicos para el control fitosanitario. Mundialmente se producen y aplican cientos de productos de origen biológico para el control fitosanitario, de estos la mayoría son a partir de bacterias, principalmente *Bacillus thuringensis*, y de diferentes especies de insectos, pero solo unas decenas de productos se obtienen a partir de hongos, nematodos, protozoos o virus. A pesar de que se conocen más de 700 especies de hongos capaces de actuar como controladores de plagas y enfermedades que afectan a diferentes cultivos, sólo unos pocos se han logrado producir y aplicar de forma estable y masiva, lo cual esta dado principalmente por el poco desarrollo tecnológico de los métodos de reproducción.

Los hongos poseen características que definen muy bien sus posibilidades como biocontroladores, por su alto poder patogénico y capacidad de producir epizootias, sin embargo, su producción a escala industrial presenta algunos de los inconvenientes que ha limitado el desarrollo de estos organismos con amplias posibilidades entomopatogénicas y antagonistas, y es precisamente el poder superar estas limitaciones lo que puede hacer posible su empleo a gran escala. La mayor o menor facilidad de realizar producción esta íntimamente ligada a la taxa, los hongos pertenecientes a la división *Matigomycotina* y *Zigomycotina* requieren un complejo nutricional más específico que los *Deuteromycetes*.

Los hongos que presentan un rango estrecho de hospederos, pero que son muy virulentos, son los más difíciles de cultivar, aún más las especies que presentan fases parasíticas y saprofiticas en sus ciclos de vida. Por ejemplo las especies de Entomophthorales son, hasta el momento casi imposibles de cultivar en medios sintéticos. En forma natural los hongos satisfacen ciertos requerimientos nutricionales para la digestión enzimática de sus hospederos. Estos requerimientos también pueden ser

suplementados en cantidades adecuadas en un medio de cultivo para lograr un máximo de crecimiento y esporulación, aun cuando debe tenerse en cuenta que estos requerimientos pueden ser diferentes para la obtención de biomasa celular o conidios, por lo tanto las técnicas y procesos de producción más adecuados pueden variar para diferente especies de hongos.

Además de los problemas tecnológicos, hay que tener en cuenta el mecanismo de acción mediante el cual actúa el microorganismo, así como su efecto se encuentra estrechamente vinculado a condiciones locales y microambientales y muy específicamente a condiciones de humedad y temperatura entre otros factores condicionantes.

La producción de biocontroladores comenzó en los años 70 y ha estado bajo mejoramiento continuo desde entonces. Se utilizan procesos diferentes para los distintos tipos de biocontroladores y cada compañía tendrá sus propios métodos.

En una operación comercial los aspectos económicos de un proceso son de capital importancia de modo que el mejoramiento del proceso ha sido hacia la obtención de productividad óptima y limitar costos (Zchultz, 2000).

Para la selección del método de reproducción es importante tener en cuenta la factibilidad tecnológica y económica, aplicando estrategias para el mayor potencial biológico.

Los aspectos a tener en cuenta deben ser:

- Selección de la cepa adecuada
- Selección de un medio de cultivo con un balance de nutrientes que permita obtener un desarrollo del hongo con el máximo potencial biocontrolador y con eficiencia económica.
- La posibilidad tecnológica y económica de escalar el proceso a nivel de producción.
- Formulación que permita periodos de almacenamiento prolongados, facilidad de aplicación y estabilidad en condiciones de campo.
- La estabilidad en el medio ambiente, puede ser, incluso más importante que la patogenicidad de la cepa en condiciones de laboratorio, por lo cual se llegan a soluciones de campo.

Se puede lograr un alta productividad de los biocontroladores impulsando tres áreas principales:

- a) mejoramiento de cepas
- b) optimización de las condiciones del proceso
- c) el mejor medio para la producción

a) Mejoramiento de Cepas

Los métodos disponibles para el mejoramiento de cepas se han aplicado extensivamente en todas las industrias para la obtención de diversos productos derivados de microorganismos. Uno de los ejemplos mas citados es la penicilina, en la cual series de mutaciones y selecciones extensivas realizadas por mas de 30 años, se han elevado la producción de las misma de 1ug/mL a 30 mg/mL, un incremento de 3000 veces. Casi todos los microorganismos son modificados actualmente por muta génesis u otras técnicas de biología molecular.

b) Optimización del Proceso

Casi todos los biocontroladores se producen en biorreactores normales de tanque agitado o sin agitar, o en sistemas sólidos con el uso de un soporte. El diseño del sistema de crecimiento puede ser crítico para alcanzar la productividad, además de las condiciones como la temperatura, pH, aireación, la agitación. La introducción de microprocesadores y computadoras para los biorreactores ha permitido que estos aparatos supervisen y controlen los distintos parámetros y registren los datos en el transcurso del proceso. Esto ha otorgado un control mas preciso de los cultivos y una reducción en los costos de mano de obra.

c) Medio de Producción

Los biocontroladores pueden tener varios mecanismos de acción. Si este mecanismo se basa fundamentalmente en metabolitos secundarios, se debe tener en cuenta que su producción se inicia casi al final del ciclo de crecimiento, iniciándose principalmente por la limitación de nutrientes. Un medio de producción típico es una mezcla heterogénea completa que a menudo utiliza ingredientes indefinidos. La adición de varios compuestos puede aumentar la producción de los metabolitos con actividad de biocontrol por lo que es

necesario definir el nutriente de cual depende la producción de este y determinar la dosis necesaria para la mayor productividad.

5.1 Hongos Productores de Antifúngicos

Los actinomicetos considerados como un grupo de microorganismos para formar moléculas orgánicas complejas con diversas actividades biológicas, como los antimicrobianos que producen.

Esta capacidad que tienen los hongos de producir antimicrobianos es compartida con otros dos grupos fundamentales de microorganismos, como son las eubacterias (organismos procariotas). Entre ellos los actinomicetos son productores de más del 70% de los antimicrobianos aislados hasta el momento principalmente la especie streptomyces, los hongos producen aproximadamente un 20% y las Eubacterias, el 10% restante (Blanco, 1985).

En las últimas décadas del siglo XIX diversos científicos descubrieron, efectos de antagonismo microbiano los cuales en algunos casos eran debidos a la existencia de sustancias difusibles con propiedades antifúngicas y antibacterianas.

5.2 Metabolismo Secundario

En el metabolismo secundario, están involucrados los metabolitos secundarios que producen los olores, antimicrobianos y toxinas que causan daño a otros organismos. No están relacionados con el abastecimiento de energía ni en los componentes estructurales del hongo ni sintetizan un producto necesario e indispensable para el hongo, pero si requieren para su producción de energía e intermediarios. Este metabolismo se presenta después del crecimiento, y pueden ser derivados de intermediarios del metabolismo primario, se consideran relacionados con el metabolismo de carbohidratos, nitrógeno y lípidos. Algunos son derivados de azúcares por ejemplo, ácido glucorónico de glucosa, muchos que contienen nitrógeno son derivados del amonio, se caracterizan por tener el primero de los átomos de hidrógeno reemplazado por un grupo alquilo (aminas), en Basidiomicetes, el olor es por las aminas, la muscardina es una amina.

También se obtienen ácidos, de la síntesis de amino ácidos aromáticos, de la vía de biosíntesis de la acetil-CoA, de polisacaridos y peptidopolisacaridos, se pueden obtener por metilación, oxidación, transaminación, decarboxilación de las moléculas.

5.3 Pigmentos

Los pigmentos de los hongos no son esenciales para el crecimiento y desarrollo del organismo, están asociados con esporas, principalmente; su importancia en el ciclo de vida es en darles a las esporas resistencia ante las condiciones ambientales. Los dos grupos principales: melaninas fúngicas, carotenoides (Csiktunádi *et al.*, 2000).

5.3.1 *Trichoderma* spp

Estas especies son antagonistas de otros microorganismos que causan enfermedades en cultivos de importancia económica. Se emplean principalmente en el control de enfermedades fungosas del suelo. Su aplicación al suelo de forma preventiva en semilleros y diferentes etapas de los cultivos reduce la aparición de enfermedades provocadas por hongos en cultivos de tabaco, pimiento y tomate.

Se produce por métodos artesanales mediante las tres alternativas, sólido, líquido estático y bifásico. Se emplean sub-productos de la industria azucarera y como soporte sólidos usan materiales celulósicos atendiendo a la alta capacidad celulolítica de estas especies.

La aplicación en forma líquida se ha empleado en hidropónicos y organopónicos para los cultivos de pimiento y tomate. El almacenamiento de los productos sólidos después de secos puede llegar a 4 meses a temperaturas inferiores a 25°C. Los líquidos son estables hasta un mes en iguales condiciones.

5.4 Control de Calidad de la Producción de Antimicrobianos a nivel de Laboratorio

Al igual que para cualquier producto de origen biológico se encuentran establecidas las normas y metodologías que regulan la calidad, no solo del producto final, si no desde las materias primas y durante todo el proceso productivo, y es la granja que tienen el productor y el agricultor. Todo el proceso de control de calidad es realizado a los diferentes niveles de organización de la producción, Centro productor hasta el Instituto de

Investigaciones de Sanidad Vegetal que dirige metodológicamente estas producciones y donde existe un grupo de trabajo especializado en el control de calidad de todas las producciones biológicas para uso fitosanitario que se realizan laboratorios.

La producción de estos productos ha tenido un incremento significativo en los últimos años, al comienzo de los años 90 y hasta el 92 se producían solamente *B. bassiana* y *M. anisopliae* posteriormente se incorporo la producción de *P.lilacinus* y *V. Lecanii* y a partir del año 1994 se producen de forma masiva las cinco líneas. Esto indica que no solo se ha incrementado el volumen de producción si no la diversidad de productos que permiten poder dar una cobertura más eficiente a los problemas fitosanitarios para los cuales están dirigidos.

TECNOLOGÍAS DE APLICACIÓN DE BIOCONTROLADORES IN VIVO

6.1 Formas de aplicación de *Trichoderma* spp

Existen cuatro técnicas diferentes para la aplicación de *Trichoderma* spp como agentes del BIOCONTROL y cada una pueden ser efectivas en el campo, especialmente son económicos aquellos métodos que introducen los antagonistas son económicos aquellos métodos que introducen los antagonistas con el material a plantar (Chet, 1990). Estas técnicas incluyen:

- Diseminación, en este caso el preparado de *Trichoderma* se disemina sobre la superficie y se incorpora dentro del suelo infestado.
- Surcos, la preparación se coloca dentro del surco a plantar.
- Zona radicular, para estos se mezcla el suelo del campo con *Trichoderma* antes del trasplante
- Cubriendo las semillas las espora de *Trichoderma* usando un adhesivo.
- Cubriendo las semillas las esporas de *Trichoderma* usando un adhesivo.

Chet y Baker (1980), descubrieron que la mínima cantidad efectiva de *Trichoderma* es de 10^6 ufc/g de suelo. En Israel, experiencias con estos agentes revelaron logros contra *R.solani* y *S. rolfsii* y *Alternaria solani* cuando se tuvo temperatura cercanas a 18°C. La temperatura óptima para el crecimiento de aislamientos son alrededor de 20°C y a temperatura menores a 18°C el crecimiento fue muy lento.

Ruppel aplicó *T. harzianum* a parcelas en aproximadamente 1×10^9 ufc/g de suelo en una banda de 10 cm a lo largo de las hileras. Este tratamiento brinda una significativa disminución de la podredumbre de la raíz causada por *Rhizoctonia* y *Alternaria* en remolacha azucarera. Parece que para obtener un control de la enfermedad con especies de *Trichoderma* se necesita en el terreno una población de por lo menos 10^5 propágulos por gramo (Knadsen, 1990).

6.2 Control de Enfermedades de los Órganos Aéreos de las Plantas mediante el Uso de Hongos

Numerosos hongos saprofitos filamentosos existen sobre las superficies de las plantas, particularmente a principios de la estación de crecimiento. En algunos casos, la aspersión de superficie foliar con preparaciones de hongos saprofitos, ha reducido de manera considerable el número de infecciones que causan los hongos patógenos y bacterias (Agris, 1991).

El tratamiento de las semillas como los cereales, maíz dulce y las zanahorias con suspensiones acuosas, pastas o polvos que contienen los hongos como *Trichoderma* spp. o *Streptomyces* sp, han protegido a las plantas contra los patógenos de la raíz y han dado como resultado un mejor crecimiento y producción de estos cultivos. Los hongos del genero basidiomicetes como el *Trichoderma* spp. aplicadas a semillas, fragmentos de semillas y raíces de plantas, han resultado en una menor incidencia de pudriciones y han dado incrementos consistentes en crecimiento y producción en varios cultivos. Aun se desconoce el mecanismo o los mecanismos por los cuales los hongos promueven el crecimiento de las plantas, e incrementan la producción de las mismas. Sin embargo, al parecer al inhibición de microorganismos tóxicos y nocivos, así como de patógenos que habitan en el suelo, por antimicrobianos o por competencia por el hierro, son algunos factores que determinan su efectividad (Agris, 1996).

6.3 Control Biológico Dentro del Manejo Integrado de Plagas

Una definición importante propuesta por la FAO (1999) es la del sistema de manejo de plagas MIP, ha evaluado las poblaciones de ellas y otros factores asociados del ambiente, utiliza todas las técnicas y métodos posibles de manera compatible para mantener los niveles poblacionales de las plagas en valores inferiores a los causantes de daños económicos a la cosecha.

De acuerdo con ello, el control biológico constituye una de las tácticas del MIP y que en las condiciones de Bolivia es la menos utilizada. Según Rosset y Altieri (1999) es la aplicación de insecticidas microbianos a base de hongos y bacterias entomopatógenos y dentro del MIP en papa, y haba se pueden incluir otra alternativa como la conservación de

enemigos naturales mediante diferentes prácticas de manejo con hongos biocontroladores.

6.4 Medios de Propagación de *Trichoderma* spp y Posibilidades de Industrialización

La fórmula mas general de propagación de *Trichoderma* spp. es a través de colonias en granos de salvado de trigo, cebada o centeno.

Hadar(1979) reporto según estudios en condiciones de viveros una relación inversa entre la cantidad de salvado de trigo *T. harzianum* agregada al terreno y la incidencia de plantas enfermas en un terreno artificialmente contaminado con *Alternaria solani* en niveles que variaron entre 2g/Kg a 10g/Kg de suelo (4.48 a 22,4 x 10⁶ g/ha a una profundidad de 15 cm). También se puede hacer tratamientos a la semilla cubriéndolas con conidias (esporas) de *Trichoderma* spp., usando como adhesivo al carboximetilcelulosa de esta manera efectiva se puede proteger la semilla del ataque de algunos patógenos (Hadar *et al.*, 1979).

La incorporación de biomasa hifal dentro de perlas de alginato, con o sin fuente adicional de nutrientes ha sido desarrollada como una forma de aplicación de *Trichoderma*. Para que ocurra micoparasitismo en el suelo, las hifas de los hongos antagonistas deben desarrollarse de las perlas de alginato, y entrar en contacto con los propágulos de los patógenos (Ejm: eclerotes) y parasitarlos.

Lewis y Papavizas (1987) aplicando al suelo píldoras de alginato conteniendo *Trichoderma hamatum*, consiguieron reducir la incidencia de la enfermedad causada por *Alternaria solani*. Existen en la actualidad productos comerciales denominados Binab PM y Binan-T-Pellets que son una mezcla de *T. Viride* y otras especies que presentan acción antagónica contra algunos hongos fitopatógenos como por ejemplo Chondodendrum purpureum (Knadsen *et al.*, 1990).

La dosificación al follaje de árboles frutales en el caso de Binab PM es de 10 g de producto comercial por litro de agua. Para la fabricación en serie de formulaciones de *Trichoderma* Lewis y Papavizas (1987) experimentaron con fermentaciones sólidas y líquidas para la obtención de conidios y clamidósporas. Por otro lado la compañía

Biotechnology General (BTG, Rehoboth, Israel) logró obtener en 60 horas 10^8 conidias de *Trichoderma* spp. por mililitro. Sin embargo, todavía no es claro si estas conidias son funcionalmente idénticas a las producidas sobre micelio aéreo Makteshin Company (Reerslava Israel) logro obtener cerca de 10^9 u.f.c de *Trichoderma* por gramo de producto al cabo de 7 días de fermentación sólida; estas preparaciones brindan un control significativo en semilla afectadas por *Alternaria solani* (Lewis y Papavizas, 1987).

OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

- Evaluar la actividad biológica antagonica de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 en el control de crecimiento de *Botrytis cinerea* en cultivos de haba de la localidad la comunidad de Chirapaca, Altiplano Norte.

7.2 Objetivos específicos

- Establecer cultivos en lotes estanco de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 para la producción de metabolitos secundarios.
- Establecer pruebas *in vitro* de actividad biológica de los filtrados obtenidos en los cultivos en batch de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 a escala de laboratorio.
- Realizar estudios cromatográficos biodirigidos de los filtrados obtenidos en los cultivos en batch de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1.
- Establecer pruebas a nivel de campo, de los filtrados como de los extractos obtenidos por cromatografía en los cultivos en batch de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1.
- Identificar por métodos moleculares la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD -1

DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1 Material y Métodos

- Equipos utilizados

Ver anexo 1

- Reactivos utilizados

Ver anexo 2

8.1.1 Material Biológico

8.1.1.1 Microorganismos Antagónicos

Un tamizaje previo de la actividad biológica fue realizado mediante una prueba indirecta (Método de excavación en placa), con la finalidad de seleccionar el mejor hongo biocontrolador. Estos microorganismos fueron estudiados con anterioridad, comprobándose su capacidad biocontroladora sobre fitopatógenos (Astorga, 2005). Los cuales fueron codificados de la siguiente manera:

- 12 QD-1
- 24 QD
- 8 QD
- 178 QD
- 22 QD
- 291 QD

De los cuales la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD-1 fue seleccionada por presentar la actividad biológica más efectiva contra *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*.

8.1.1.2 Microorganismos Fitopatógenos

Proporcionados por el cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

- *Botrytis cinerea*
- *Alternaria solani*

8.2 Activación de Cepas Antagonistas y Fitopatógenas

Se reconstituyeron los cultivos liofilizados provenientes del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B), por el método de Kienholz, mediante el cual se obtuvo una suspensión de esporas de 1×10^6 de los viales con los diferentes microorganismos. Para ello se sumergió el asa y se depositó en placas de Petri con medio-agar papa dextrosa (PDA - ver anexo 3) y gentamicina ($75 \mu\text{g/ml}$) dejando incubar a 26°C hasta el desarrollo de la colonia, para la obtención de cultivos monospóricos y posterior identificación de estos microorganismos saprofitos antagonistas.

8.2.1 Obtención de Cultivos Monospóricos

Se prepararon placas con agar agua 3%, realizándose asépticamente una suspensión de esporas de concentración 1×10^6 esp/mL. Con un asa se estrió una gota de la suspensión sobre un medio de cultivo. Se ubicaron las esporas para asegurarse que la colonia se originara a partir de una sola célula.

8.2.2 Cultivos de Punta de Hifa

Se sembró una porción circular (1 cm de diámetro) del hongo en la parte central de un medio de cultivo fresco con adición de gentamicina ($75 \mu\text{g/ml}$), contenido en la placa. Al observar el desarrollo de las hifas separadas en el medio se ubicó una punta en el microscopio con 100 aumentos y se cortó la hifa detrás de la célula terminal con un bisturí estéril. El trozo de agar que contenía la hifa se transfirió a una placa de Petri con medio fresco. Se incubó a 26°C hasta el desarrollo de la colonia fúngica.

8.3 Identificación Macroscópica y Microscópica de Hongos Haprofitos

Tomando en cuenta las claves dadas por Hoestria y Samson (1981), Samson (1989), Pitt (1988); Gams y Domsch (1980); Barnett (1998) para realizar examen macroscópico y microscópico en placa de hongos filamentosos del suelo, se procedió a realizar el:

- **Examen macroscópico en placa**
- **Examen microscópico en cultivos sobre cubreobjetos**

8.3.1 Examen Macroscópico en Placa

Una vez desarrollado el hongo hasta el día séptimo en medio de cultivo sólido (PDA) y con el fin de determinar a que género pertenecen se observaron visualmente las placas de Petri, tomando en cuenta las siguientes características:

a) En el anverso de la placa Petri

- El tamaño de la colonia
- Aspecto: Algodonoso, seco, polvoriento, velloso, comprimido.
- Producción de exudados

b) En el reverso de la placa Petri

- Aspecto: Liso, Rugoso, Comprimido.
- Pigmento: Presente o no presente

8.3.2 Examen Microscópico en Cultivos sobre Cubreobjetos

Se esterilizó una placa de Petri que contenía un disco de papel de filtro embebido en 2% de glicerina (ver anexo 2), una vara de vidrio en forma de z para el soporte del portaobjeto y cubreobjeto y medio sólido PDA en placa de Petri. Se cortó un cilindro del medio de cultivo preparado, con la ayuda de un sacabocados de tamaño menor al cubreobjeto, se colocó en el centro del portaobjeto. Se inoculó el cilindro de agar con esporas o trozos de micelio del hongo a estudiarse ubicando el inóculo a distancia del borde del cilindro. Se cubrió la preparación con el cubreobjeto y se incubó a 26 °C.

Para la identificación microscópica se obtuvo la muestra a dos días de crecimiento del micelio para lo cual se utilizó la técnica del cintazo: Añadiendo una gota de azul de lactofenol (ver anexo 2) o una gota de hidróxido de potasio al 10% sobre un portaobjetos donde fue adherido el lado engomado de la cinta adhesiva conteniendo el micelio, posteriormente se observó en el objetivo de 40X para una observación más detallada de las características más importantes que nos llevaron a determinar el género de los hongos en estudio. Se tomaron en cuenta las siguientes características taxonómicas para la clasificación a nivel de género, al tratarse de hongos filamentosos.

- Conidióforos: Hialinas, verticiladas o no verticiladas, alargados, septados, Verticiladas, etc.
- Forma de conidios: Ovalados, redondos, alargados, esféricos etc.
- Fialides: Simples o en grupos.
- Micelio: Septado o cenocítico.
- Color de las cabezuelas conidiales
- Cleistotecios: Presente o no presente

8.4 Antagonismo en Cultivo

8.4.1 Método Directo: De acuerdo a Bell *et al.*, (1982), consiste en el desarrollo simultáneo de los microorganismos antagónicos y patógenos en medios que le permitan su crecimiento en placas de Petri, bajo las mismas condiciones. Los parámetros considerados se observan en la Figura 1.

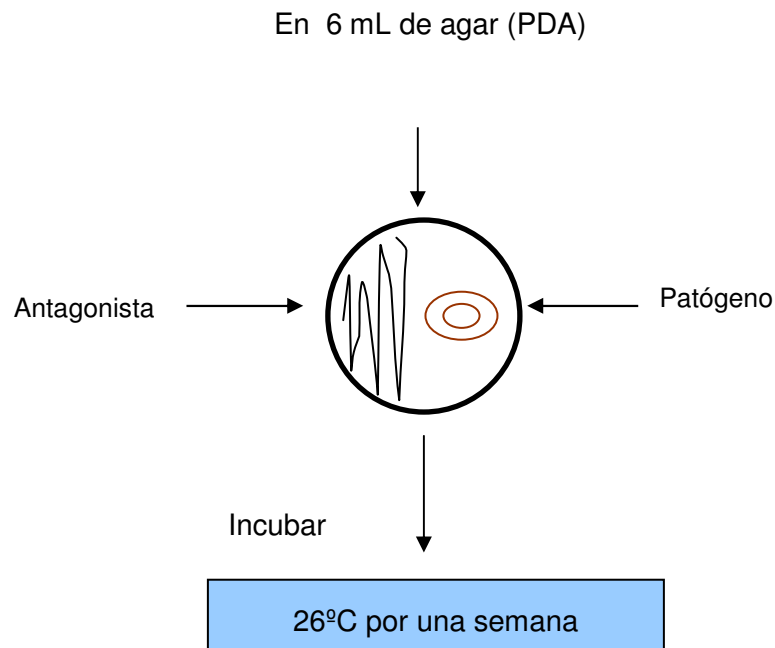


Figura 1. Desarrollo simultáneo de antagonista y patógeno en medio PDA. (Prueba Directa, enfrentamiento dual)

8.4.2 Método indirecto: Consiste en el desarrollo del hongo patógeno en un sustrato previamente tratado y seguidamente la adición de una alícuota del microorganismo antagonista respectivo, de acuerdo a las recomendaciones de Mitidieri (1998). Los parámetros considerados se observan en la Figura 2.

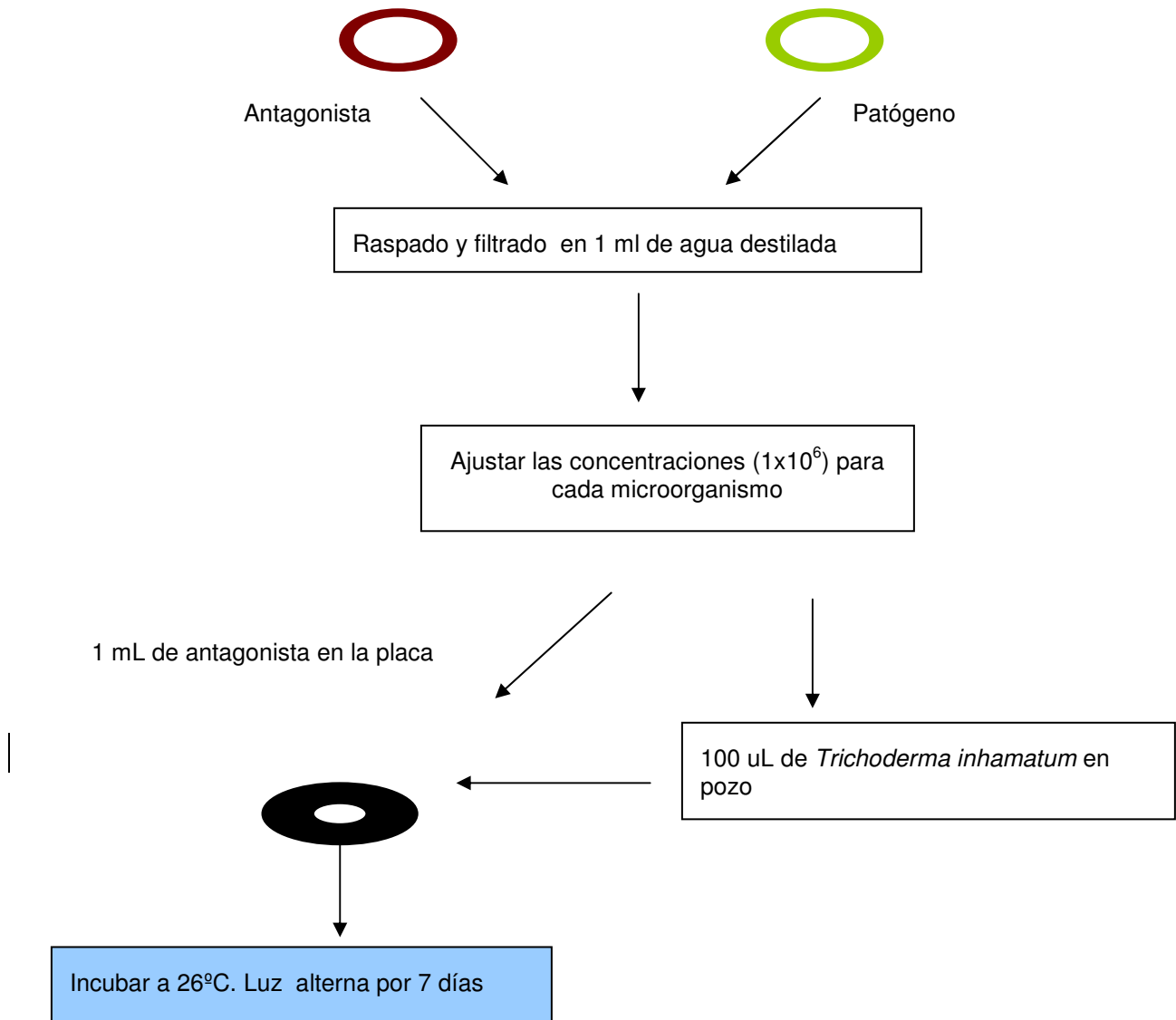


Figura 2. Desarrollo del patógeno en sustrato tratado con la adición de una alícuota del antagonista. Prueba indirecta (Método de excavación en placa).

Con el fin de realizar, los ensayos de producción de metabolitos secundarios del hongo seleccionado como mejor biocontrolador, se realizaron:

8.5 Cultivos en Batch para la Obtención de Metabolitos Secundarios

La cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1, fue previamente activada debido a que las esporas se preservan de forma liofilizada. La activación consistió en la agregación de 1 mL de caldo papa dextrosa (ver anexo 3) y se dejó incubar a 26 °C, durante 7 días. Al cabo de este tiempo, se pudo evidenciar el desarrollo del micelio. Se transfirió una asada del cultivo a placas de Petri con medio sólido PDA y se dejó en incubación como en el caso anterior, hasta el desarrollo de la colonia fúngica (Figura 3). Se cortaron cilindros de agar con micelio de cada especie fúngica y fueron transferidos a tubos conteniendo tampón tankuay (ver anexo 2). Cada tubo fue agitado para la obtención de una suspensión de esporas que fueron cuantificadas en cámara de Neubauer. Se inoculó 1×10^6 esp/mL en matraces por duplicado con 900 mL (condiciones no agitadas) de caldo papa dextrosa y se incubaron de forma estática a una temperatura de 26 °C, durante 56 días.

Para las pruebas de inhibición sobre fitopatógenos se colectaron, diariamente durante 56 días de experimentación, 5 mL de sobrenadante del cultivo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 centrifugados a 3500 rpm durante 30 minutos. Los cuales fueron guardados y etiquetados debidamente en viales estériles a -20 °C (Figura 3).

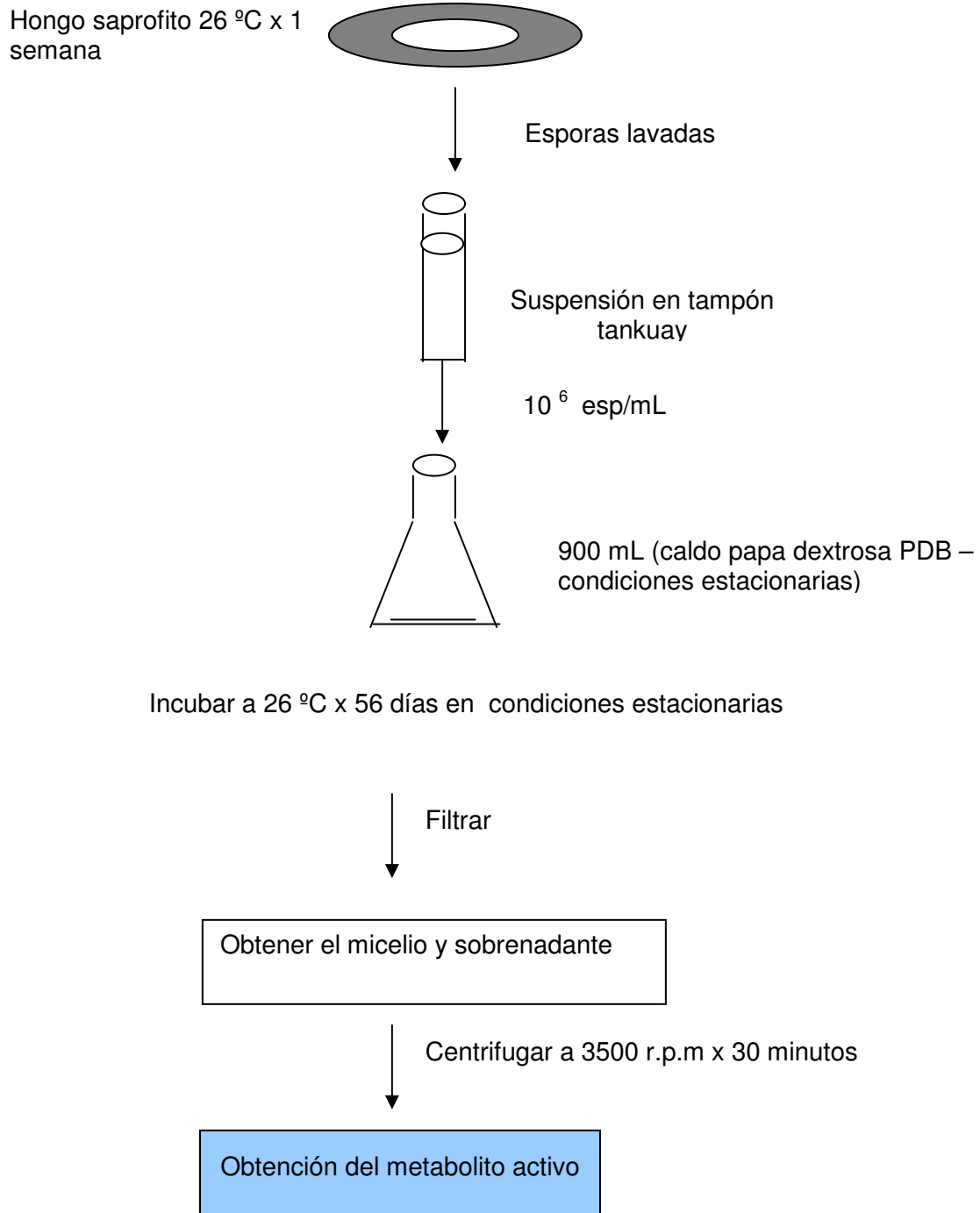


Figura 3. Obtención de metabolitos activos de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 producidos en cultivo homogeneizado

8.6 Evaluación de la Actividad Antifúngica

El filtrado que contiene los metabolitos activos, obtenidos a diferentes tiempos, es enfrentado con los microorganismos en prueba (ver anexo 6), siguiendo la técnica de dilución en placa (Excavación-Placa-Cultivo) que es una modificación de la técnica Cilindro –Placa-Cultivo recomendado por la Farmacopea Americana USP XXII.

8.7 Determinación de la Actividad Antifúngica

El filtrado que contiene los metabolitos activos, obtenido de los cultivos en batch en condiciones no agitadas recolectados de 56 tiempos en el medio (caldo papa dextrosa), fueron enfrentados con los microorganismos en prueba (*Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*). Se realizaron diluciones 1:6 con cada uno de los filtrados de los cultivos en batch no agitado (900 mL) de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12QD-1 desarrollado en caldo papa dextrosa, de manera que en cada placa de Petri de 7 mL de capacidad con 5 mL de agar papa a pH 6,5 se inoculo 1 mL del filtrado. Posteriormente se inoculo 100 μ L de esporas de los fitopatógenos a una concentración de 1×10^6 esp/mL en los pocitos de 0,2 cm situados al centro de las placas de Petri de 7 mL de capacidad para evaluar la actividad inhibitoria de crecimiento utilizándose como control positivo fungicida químico (Mancozeb) a una concentración de 100 μ g/mL y un control negativo solo el medio con 100 μ L de esporas en el pocito a una concentración de 1×10^6 esp/mL, luego se incubaron las placas a 26 °C por 10 días.

8.8 Medición de la Actividad Inhibitoria del Crecimiento de los Fitopatógenos

La lectura se realizó por visualización de crecimiento del frente hifal, realizando las mediciones en las cuatro orientaciones cardinales con la ayuda de una regla milimetrada desde el borde del inóculo a la punta del micelio.

La medición de la actividad inhibitoria se realizó mediante el cálculo de velocidad de crecimiento (μ) (Figura 4).

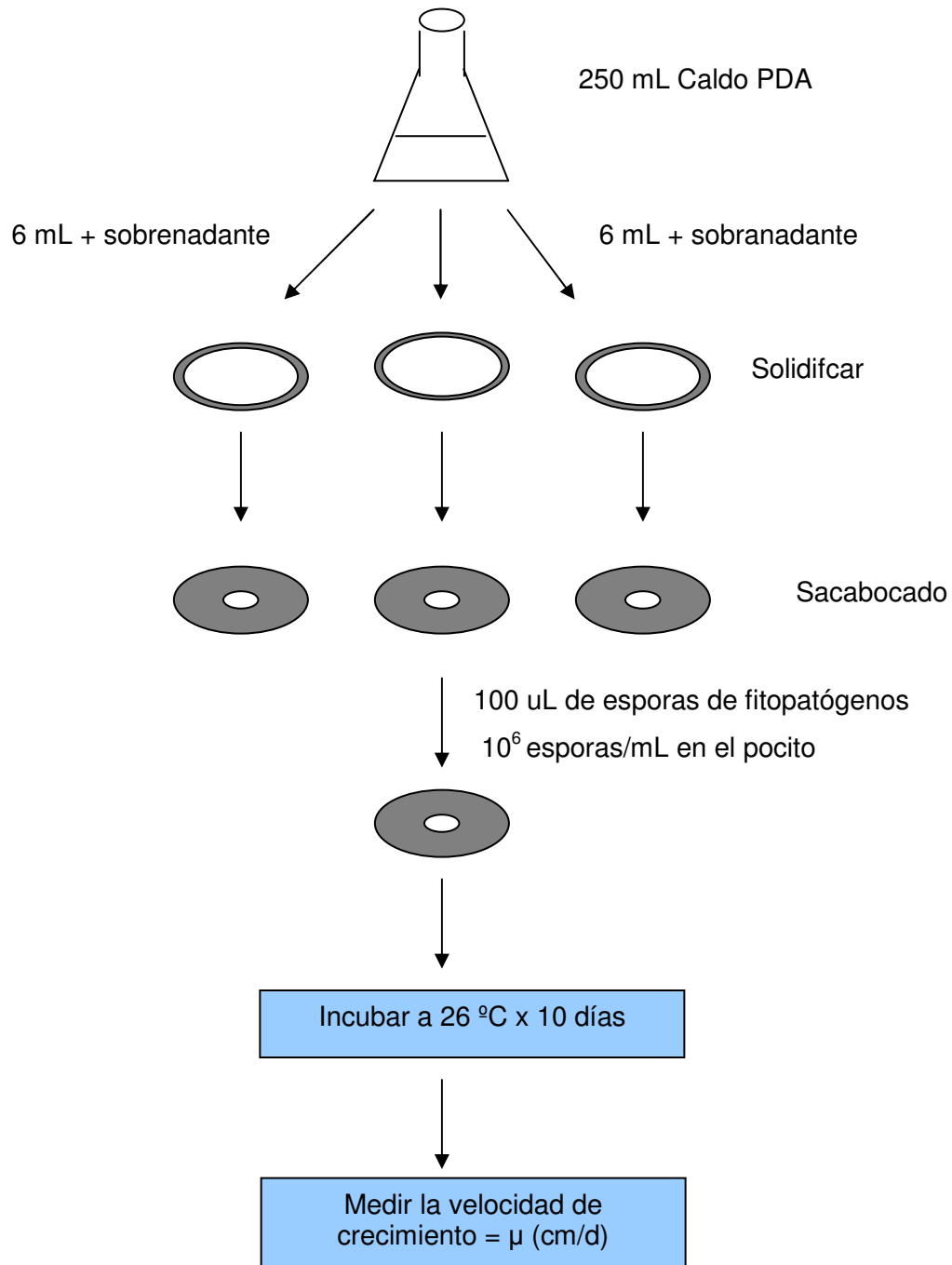


Figura 4. Actividad antifúngica de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1

8.9 Bioensayo en gota

8.9.1 Cámara Húmeda

Las hojas sanas recién cortadas de plantas de haba que fueron cultivadas en el laboratorio, se rasparon suavemente en un punto del envés foliar utilizando un escalpelo.

En cada punto se inoculo 100 μ L de filtrado de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD- 1 y el fitopatógeno a una concentración de 10^6 esporas/mL. El control negativo fue agua y el positivo la suspensión de mancozeb (0,009 mg/L), agroquímico utilizado en estos cultivos de acuerdo a las recomendaciones de Mitidieri (1998). Se colocó una hoja por placa de Petri con base de papel de filtro humedecido para incubarlos a 26°C por una semana.

8.10 Fase de Invernadero

8.10.1 Fase de Pretratamiento

8.10.1.1 Producción de Esporas de *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*

El hongo fue sembrado en placas de Petri que contenían medio PDA, medio complejo para el crecimiento e incremento de las esporas.

Posteriormente las placas de Petri fueron incubadas a 26°C por 7 días aproximadamente pasado este tiempo las esporas fueron extraídas o lavadas con tampón tankuay utilizando para ello un agitador; finalmente se colectaron las esporas en frascos de vial, ajustadas a una concentración de 1×10^6 esp/ml que posteriormente fueron utilizados en las pruebas de invernadero.

8.10.2 Tratamientos en Invernadero

El experimento se instalo adaptando un invernadero el 25 de mayo del 2005 (ver anexo 4), el cual se llevo a cabo manteniendo una temperatura promedio dentro del invernadero

a 25 °C con una mínima y máxima de 15 °C a 26 °C respectivamente, la temperatura fue adecuada para el normal desarrollo de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*.

8.10.2.1 Prueba de Germinación

Las semillas de haba fueron sometidas a la prueba de germinación, para lo cual se colocaron las semillas en las placas de Petri conteniendo filtro estéril y humedecido con agua destilada estéril, en cada una de las cinco placas de Petri se colocaron en forma equidistante 10 semillas y luego las placas fueron colocadas en la incubadora e invernadero alternadamente a 25 °C por 7 días, que finalmente fueron expresados como porcentaje de germinación.

8.10.3 Preparación de Materiales en las Pruebas de Invernadero

Las macetas con capacidad para 1 kg de tierra fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 0,4 % durante 3 minutos y luego enjuagadas con abundante agua destilada estéril (ver anexo 4).

El suelo utilizado es un abono orgánico (estiércol de oveja + tierra roja) muy bueno para la siembra de haba (*Vicia faba*). Posteriormente la tierra fue preparada en bolsas conteniendo 1 kg de tierra, las cuales fueron esterilizadas por autoclave a 1,2 atmósferas de presión por 1 hora y tres veces consecutivas, encontrándose listas para las pruebas respectivas en invernadero.

Se utilizaron 70 macetas con suelo estéril y una semilla de haba en cada maceta que fueron cuidadosamente seleccionadas para el presente ensayo. Cada grupo fue distribuido considerando el experimento completamente al azar con 7 tratamientos y cada uno con 10 repeticiones.

8.10.4 Pruebas de Biocontrol en cada Tratamiento

Se aplicó 1 mL de filtrado del tiempo 56, por presentar mejor actividad inhibitoria sobre la semilla en germinación, que contiene 100µL del fitopatógeno a una concentración de 10⁶ esp/mL (Se adaptó esta metodología al método desarrollado por French (1980).

Se contó para ello con un testigo blanco que consistió sólo en la siembra de la semilla en suelos previamente esterilizados y agua destilada estéril (B-M-) y (A- M-). Donde: B- = Ausencia de *Botrytis cinerea*; M- = Ausencia del filtrado del cultivo de la cepa *Trichoderma inhamatum* 12 QD-1; A- = Ausencia de *Alternaria solani*

El segundo tratamiento, denominado testigo tanto con *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* consistió en la aplicación del fitopatógeno y en este tratamiento no se empleara ningún microorganismo antagónico (B+M- y A+M-). Donde: B+= Presencia de *Botrytis cinerea*; A+= Presencia de *Alternaria solani*; M-=Ausencia de microorganismo.

Al tercer tratamiento se aplicó el biocontrolador sobre los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* (B+T y A+T). Donde: B+= Presencia de *Botrytis cinerea*; A+= Presencia de *Alternaria solani*; T= Cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1.

El cuarto tratamiento consistió en la aplicación del fungicida químico mas los fitopatógenos *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. (A+FQ y A+FQ).Donde: A+= Presencia de *Alternaria solani*; FQ= Fungicida químico

Los tratamientos considerados fueron:

To: (Testigo blanco) = Suelo estéril + 1semilla sin tratamiento (testigo)

Para el experimento con *Botrytis cinerea*

T1: B+M-= Suelo estéril + 100µL de fitopatógeno a una concentración de 1×10^6 esp/mL aplicado sobre la semilla.

T2: B+T= Suelo estéril + 1 mL de filtrado de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre el fitopatógeno +100 µL del fitopatógeno a una concentración de 1×10^6 esporas /mL aplicado sobre la semilla.

T3: B+FQ = Suelo estéril + 1 ml/L de fungicida químico (Mancozeb) sobre el fitopatógeno + 100 µL del fitopatógeno a una concentración de 1×10^6 esp/mL aplicado sobre la semilla.

Para el experimento con *Alternaria solani*

T4: A+M= Suelo estéril + 100µL de fitopatógeno a una concentración de 1×10^6 esp/mL aplicado sobre la semilla.

T5: A+T= Suelo estéril +1 mL de filtrado de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre el fitopatógeno +100 µL del fitopatógeno a una concentración de 1×10^6 esp/mL aplicado sobre la semilla.

T6: A+FQ = Suelo estéril + 1 ml/L de fungicida químico (Mancozeb) sobre el fitopatógeno + 100 µL del fitopatógeno a una concentración de 1×10^6 esp/mL aplicado sobre la semilla.

Las macetas se ubicaron con todos los tratamientos en un invernadero acondicionado, cuya temperatura promedio fue de 25 a 26 °C, respectivamente.

Las macetas sembradas se regaron diariamente con agua en una cantidad de 50 mL por cada maceta.

Modelo Estadístico

Se empleo el modelo de análisis de varianza a un criterio de clasificación ANOVA 1, con un diseño experimental completamente aleatorio con efectos fijos de 10 repeticiones. Para determinar que tratamiento hace la diferencia, se aplico la prueba de LSD para pares de medias con el fin de ver que diferencia es la más predominante.

$$Y_{ij} = u + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = j-ésima observación del i-ésimo tratamiento

U = Promedio Verdadero (general)

T_i = Efecto Fijo del i-ésimo Tratamiento

E_{ij} = Efecto Aleatorio de los Residuales

i = 1, 2, 3, 4, 5.....Tratamientos

j = 1, 2, 3, 4, 5.....Unidades Experimentales o Repeticiones

8.10.5 Parámetros a evaluar en la plántula

8.10.5.1 Tallo, peso fresco y seco de la plántula por cada tratamiento

Se evaluó el comportamiento de altura y peso respectivamente para que nos dé un enfoque más directo y a la vez nos pueda indicar el grado de antagonismo.

Especialmente cuales fueron eficientes y redujeron considerablemente al fitopatógeno, siendo una evaluación muy importante en el trabajo.

8.11 Estudios Cromatográficos

Para determinar las fracciones responsables de la actividad antifúngica se tomó la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 y se procedió de la siguiente manera:

8.11.1 Obtención de Extractos

Se tomaron 950 mL de caldo de cultivo del tiempo 56 con pigmento de color amarillo, el cual fue centrifugado por 30 minutos a 4500 rpm y luego filtrado por cromatografía en columna fase reversa CCRP18.

El filtrado fue eluido con diferentes mezclas de MeOH-H₂O 40-60, MeOH-H₂O 60-40 y MeOH 100%. Estas tres fracciones obtenidas fueron desecadas en un rotaevaporador y concentradas al vacío a presión reducida y a una temperatura menor a 40 °C, consiguiendo de esta manera extractos crudos libres de solventes orgánicos (Figura 5).

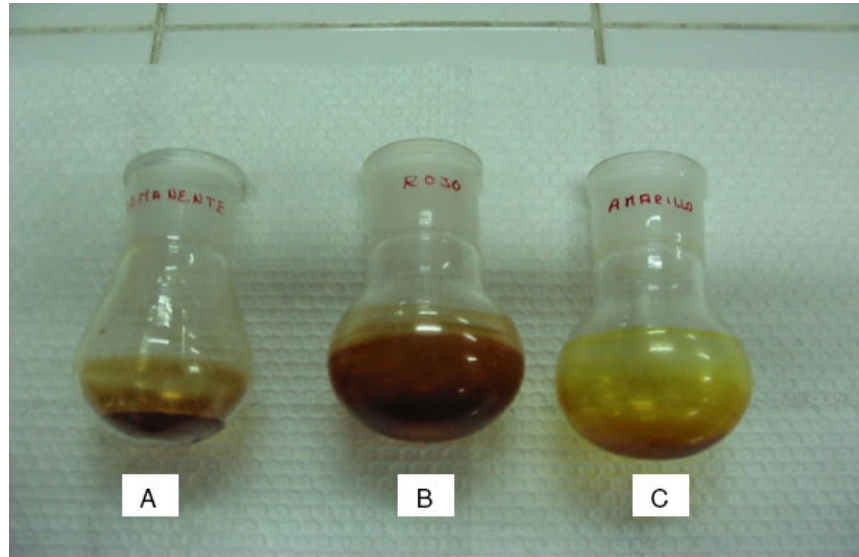


Figura 5. Obtención de tres fracciones del fermento de 950 mL de cultivo (caldo papa dextrosa) con la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1. A) Fracción obtenida mediante la elución con la mezcla H₂O/MeOH: 40/60 B) Fracción roja obtenida mediante la elución de 100% con MeOH C) Fracción amarilla obtenida mediante la elución con la mezcla H₂O/MeOH: 60/40.

Finalmente se calculo el rendimiento de cada una de las fracciones obtenidas y se realizaron pruebas biológicas.

8.11.2 Evaluación de la Actividad Antifúngica por el Método de Mitscher

Preparación de las Microplacas de 24 Pozos

Se utilizaron microplacas tipo ELISA, denominadas TC24

Preparación de los extractos

De la cantidad en miligramos del extracto obtenido de color amarillo, se pesaron 15 mg del extracto en estudio, para iniciar con una concentración inicial de 7,5 mg/mL, se peso el doble (15 mg) para la concentración inicial ya que posteriormente se hizo diluciones hasta llegar de esta forma a la concentración deseada.

Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio PDA (DIFCO), se pesó para 27 mL y se disolvió en agua destilada. Se autoclavó a 121 °C y 1,5 atm por 15 min.

Preparación del medio de cultivo con esporas

Después que se autoclavó el medio se sacó y se esperó que enfriara a una temperatura aproximada de 38 °C. En área estéril se añadió 27 µL de esporas a una concentración de 1×10^6 esp/mL por los 27 mL de medio preparado.

Preparación de las cajas TC 24 pozos con los extractos (2 mL de volumen)

Los 15 mg de extracto crudo se disolvieron en 2 mL de agua destilada autoclavada, de tal manera que se obtuvo un volumen total de 2 mL en un vial.

Primera dilución: Se colocaron los 2 mL en el primer pozo. Se sacó 1 mL y se colocó en el segundo pozo, de tal manera que se llegó a una concentración de 7,5 mg/mL en el primer pozo.

Segunda dilución: a 1 mL de agua destilada que tiene el segundo pozo se añadió 1 mL del primero, se mezcló bien y se sacó 1 mL el cual se colocó en el tercer pozo, obteniéndose una concentración de 3,75 mg/mL.

Todas estas diluciones se realizaron hasta llegar a una concentración final de 0,47 mg/mL.

Llenado de la microplaca TC 24 con el medio de cultivo con esporas

En una microplaca de 24 pozos se probó la actividad de los tres extractos obtenidos (amarillo, rojo, remanente), frente a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*.

Sobre las diluciones realizadas se colocó 1 mL de medio PDA en cada pozo más esporas (concentración de 1×10^6 esp/mL) en cada pozo y se esperó a que gelifique (medio más

esporas), control positivo (medio + esporas + mancozeb 9,76 ppm) y control de esterilidad del medio. Se incubó la microplaca a 25 °C por 24 horas.

Lectura de la microplaca

Después de 24 horas de incubación se realizó la lectura de la microplaca por visualización, observándose el crecimiento o inhibición. Se comparó con los controles positivos y negativos; en el control negativo se observó crecimiento, lo que significó el crecimiento de los hongos, el control positivo se encontró libre de desarrollo. Los pozos con extractos que se observaron crecimiento fúngico significaron acción inhibitoria negativa y los limpios como acción inhibitoria positiva. La lectura fue cualitativa respecto a la población de microorganismos y cuantitativa respecto a los extractos.

A continuación se detalla el esquema utilizado para la realización de ésta prueba (Figura 6).

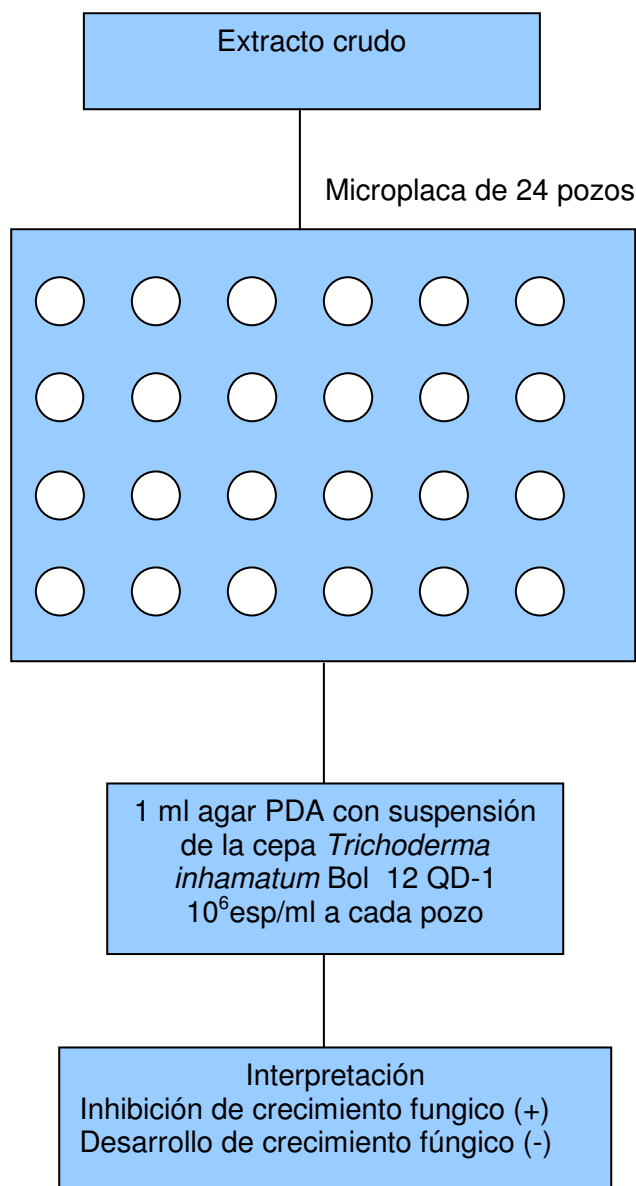


Figura 6. Evaluación de los extractos (amarillo, rojo y remanente) en placas de ELISA denominadas TC24 a diferentes concentraciones.

8.11.3 Determinación de la actividad antiparasitaria *in vitro*

La actividad Leishmanicida y Chagásica de las muestras fue medida sobre cultivos *in vitro* del estadio promastigote de cepas de *Leishmania braziliensis* 2903, *L. amazonensis* pH8 y *L. donovani* PP75 y *Tripanosoma cruzi* mediante la prueba de inhibición del desarrollo del parásito en placas de microtitulación. Los resultados de actividad Leishmanicida y

sobre *Tripanosoma cruzi* son expresados en valores de IC50 (Concentración de la droga que inhibe el 50% del desarrollo del parásito, obtenido mediante una típica curva dosis respuesta (log de la concentración de la droga frente % de inhibición). Estas pruebas fueron realizadas por la Licenciada en Bioquímica Grace Ruiz en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

8.11.4 Fraccionamiento Químico Biodirigido del Extracto de la cepa con mejor Actividad Antifúngica

8.11.4.1 Cromatografía en Capa Fina (TLC)

Con ayuda de una Pipeta pasteur, las tres fracciones extraídas se aplicaron sobre placas cromatográficas con soporte de gel sílice con fluorescencia UV 254 nm de 25 um de espesor con base de aluminio.

Posteriormente fueron secadas al ambiente utilizando como eluyente más apropiado para nuestro trabajo Acetato de etilo: Metanol a razón de 90:10, luego de un tiempo prudente hasta que el eluyente migre, delimitando la razón de frente.

8.12 Fase de Campo

Determinada la actividad de la fracción obtenida del pigmento amarillo, producido por la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1, tal como se describe en la metodología se procedió a evaluar *in vivo* (pruebas en campo).

a) Localización

El experimento se instaló en los campos de la comunidad de Chirapaca (Figura 7) dependiente de la provincia los Andes; ubicado en el altiplano Norte de la ciudad de La Paz, a 50 km. de la ciudad de La Paz, el 17 de septiembre del 2005. La zona geográficamente está situada entre las coordenadas 15° 53' latitud Sur y a 65° 23' longitud Oeste, y una altitud aproximada de 3.830 m (Instituto Geográfico Militar, 1991).

Figura 7. Mapa de la región de Chirapaca



b) Temperatura

La zona presenta un clima árido con predominancia semihúmedo, con una temperatura promedio anual de 17 °C en verano y 10 °C en invierno.

c) Precipitación Pluvial

La precipitación pluvial anual promedio es de 455 mm (Estación Metereológica de Tiwanaku, 2001).

d) Topografía y Suelo

La zona presenta una serie de microcuencas, donde las aguas pluviales son desembocadas al lago Titicaca.

Los suelos predominante en el área de estudio son: franco limoso, franco arcilloso y arenoso, que son apropiados para el cultivo de haba (Chilon, 1992).

8.12.1 Establecimiento de la Parcela Experimental

El suelo utilizado es un abono orgánico (Estiércol de oveja + tierra roja) muy bueno para la siembra de haba.

Se utilizaron 24 plantas, cada grupo fue distribuido en distintas parcelas considerando el experimento completamente al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones. Estas parcelas fueron divididas en cuadrantes de un metro cuadrado (Figura 8).



Figura 8. Establecimiento de la parcela experimental para la aplicación de los extractos obtenidos en laboratorio, en el control de la mancha chocolate en cultivos de haba

a) Preparación del Suelo

Se realizó la remoción y desterronado del suelo con tractor un mes antes de la siembra, también se efectuó la labor de arado, cruzado y nivelación con tracción animal.

b) Siembra

Se efectuó en surcos abiertos, con dos semillas por cada golpe, la distancia entre surcos fue de 0,50 cm a 0,80 cm entre plantas a una profundidad de 0,30 m, según la práctica de los agricultores.

c) Riego

No hubo necesidad de efectuar riego suplementado debido a que la precipitación durante el ensayo alcanzo valores dentro del promedio normal para la zona.

d) Deshierbe

Fue efectuado durante la fase de macollamiento y floración

e) Cosecha

Se realizaron en forma manual, una vez que las plantas alcanzaron su estado óptimo a los 100 días de la siembra.

8.12.2 Variables Experimentales

- Extractos naturales
- Dosis de aplicación

8.12.2.1 Aplicación de Tratamientos

FACTOR A: Extractos naturales

E1 = Extracto amarillo mas rojo

E2 = Extracto crudo 1

E3 = Extracto crudo 2

E4 = Extracto crudo 3

E5 =Fungicida químico

E6 = Agua

Factor B: Dosis de extractos

D = Dosis de cada extracto (laboratorio)

8.12.2.2 Determinación de la Concentración de Extractos para la Aplicación en el Tratamiento de la Mancha Chocolate en Cultivos de Haba

El valor de la absorbancia de la fracción amarilla (H₂O/MeOH: 60/40) fue usado para calcular la concentración de los extractos (Tabla 5). La curva de calibración fue lineal a 370 nm. En este método en un tubo de ensayo con 1 mL de la muestra (fracción amarilla - H₂O/MeOH: 60/40) se añadió 2 mL de agua destilada y se mezcló vigorosamente y se leyó en espectrofotómetro a 180 – 1.100 nm (cintra 5, GBC Scientific). Las muestras fueron diluidas 20 veces para que los datos se encuentren dentro de la linealidad de la curva estándar hasta una absorbancia de 2,24 nm correspondiendo a una concentración de 0,70 mg/mL (ver anexo 5). Una vez obtenidos los valores de absorbancia y concentración estas dos variables se relacionaron con el porcentaje de inhibición de los 56 días de experimentación (ver detalle anexo 6).

Tabla 5. Las dosis presentadas fueron calculadas después de la determinación de concentraciones apropiadas en el laboratorio.

Tratamiento	Extractos	Dosis (mg/ml)
1	Extracto amarillo + rojo	0,436
2	Extracto crudo 1	0,319
3	Extracto crudo 2	0,330
4	Extracto crudo 3	0,384
5	Funguicida químico	0,009
6	Testigo (aplicación de agua)	-----

8.12.3.1 Variables de respuesta

- Incidencia
- Gravedad
- Eficiencia
- Número de vainas
- Longitud de vainas peso de 100 semillas
- Rendimiento en grano seco

8.12.4 Formulación de los Productos Biológicos para la Aplicación en el Cultivo

La formulación de los productos biológicos para la aplicación en el cultivo de haba, en el control de la mancha chocolatada se realizó después de la determinación de la dosis apropiada, determinados en el laboratorio.

El adherente empleado tuvo las siguientes especificaciones:

Nombre comercial: CARRIER “aceite vegetal”

Acción: Esteres de ácidos grasos (3%)

Glicerol (7%)

Formulación: Dosis de aplicación es de 1–2 L/ha

8.12.5 Aplicación de los Extractos al Cultivo de Haba

La aplicación de los fungicidas naturales se realizó en forma preventiva, antes que el patógeno infecte al cultivo, el cual facilitó la evaluación de la incidencia, gravedad y eficiencia del control de los extractos.

La primera aplicación se realizó a los 20 días de la germinación del cultivo de haba, en horas de la mañana y tarde bajo un clima adecuado para la fumigación.

La aplicación de los extractos naturales fue realizada cada 7 días a partir de la primera aplicación, de manera continua hasta la fase de floración y fructificación.

Las evaluaciones de incidencia, gravedad y eficiencia se realizaron cada 30 días, en plantas muestreadas al azar por cada unidad experimental de acuerdo a las recomendaciones por Villarroel (2000).

8.12.6 Pruebas de Biocontrol en Cada Tratamiento

Se aplicó el filtrado de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 y el procesado por cromatografía en columna (fracción amarilla) a las plantas de haba, que contiene el

fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Se adaptó esta metodología al método desarrollado por French *et al.*, (1988).

El primer tratamiento se aplicó de forma alternativa, filtrado biológico crudo sin ser procesado por cromatografía en columna (pigmento rojo) a una concentración 0,436 mg/mL y la fracción amarilla obtenida por cromatografía con una concentración de 0,436 mg/mL (B+FBP+FBC). Donde: B+=Presencia de *Botrytis cinerea*; FBP= Filtrado biológico procesado de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 (fracción amarilla); FPC= Filtrado biológico crudo de color rojo de la cepa *Trichoderma* sp Bol 12 QD-1.

El segundo, tercer y cuarto tratamiento consistieron en la aplicación del filtrado crudo a una concentración de 0,319 mg/mL, 0,330 mg/mL, 0,384 mg/mL (sin ser filtrado por cromatografía en columna fase reversa CCRP18) sobre *Botrytis cinerea* (B+FBC). Donde: B+=Presencia de *Botrytis cinerea*; FBC= Filtrado biológico crudo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1.

El quinto tratamiento denominado control positivo con el fitopatógeno *Botrytis cinerea* y el fungicida químico a una concentración de 0,00976 mg/mL (B+FQ). Donde: B+= Presencia de *Botrytis cinerea*; FQ= Fungicida químico (Mancozeb)

EL sexto tratamiento contó con un testigo blanco que consistió en la aplicación de agua sobre las plantas de haba sin la presencia del fitopatógeno *Botrytis cinerea* (*Vicia faba*) (B-FB-). Donde: B-=Ausencia de *Botrytis cinerea*; FB-= Aplicación de agua

Los tratamientos considerados fueron:

Para el experimento con *Botrytis cinerea*

B-FB-(Testigo blanco) = Suelo + plantas sin tratamiento + sin el fitopatógeno *Botrytis cinerea* (testigo)+regadas cada 15 días con agua.

B+FQ (Control positivo) = Suelo + fungicida químico (Mancozeb) 0,00976mg/mL aplicado cada 15 días + fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

B+FBP+FBC= Suelo + filtrado biológico crudo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD- 1 y filtrado biológico procesado (fracción amarilla) aplicado cada 15 días sobre el fitopatógeno *Botrytis cinerea* + filtrados biológicos obtenidos de 56 días.

B+FBC = Suelo + filtrado biológico crudo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 aplicado cada 7 días + filtrado biológico obtenido de 56 días.

B+FBC = Suelo + filtrado biológico crudo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 aplicado cada 10 días + filtrado biológico obtenido de 56 días.

B+FBC = Suelo + filtrado biológico crudo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 aplicado cada 15 días + filtrado biológico obtenido de 56 días.

8.12.7 Determinación de la Incidencia de la Enfermedad

La determinación de la incidencia de la enfermedad se realizó según la fórmula propuesta por French y Herbert (1988), mediante cuantificación de plantas por unidad experimental.

$$I = \frac{NPE}{TPO} \times 100$$

Donde:

I= Incidencia (%)

NPE= Número de plantas enfermas

TPO= Total de plantas observadas (sanas + enfermas)

8.12.8 Determinación de la Severidad de la Enfermedad

La gravedad de la enfermedad se determinó mediante escalas diagramáticas elaboradas de acuerdo a las recomendaciones de French y Herbert (1988).

8.12.9 Determinación de la Eficiencia de los Extractos Naturales

La determinación de la eficiencia de los extractos naturales se realizó mediante la fórmula de Henderson y Tilton (1986), citado por Villca (1995) donde las evaluaciones de

eficiencia se realizaron después de 48 horas de la aplicación, según las recomendaciones de Villarroel (1997).

$$E = \frac{1 - T_d - t_a}{T_a - t_d} \times 100$$

Donde:

E = Eficiencia del extracto

T_a = Lectura del tratamiento antes de la aplicación

T_d = Lectura del tratamiento después de la aplicación

T_a = Lectura del testigo antes de la aplicación

T_d = Lectura del testigo después de la aplicación

8.13 Identificación Molecular de la Cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1

La cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 fue cultivada en medio de mantenimiento sin agar. El micelio fue retirado con aproximadamente 1,5 mL de agua ultrapura, se lavó dos veces, que fue plaqueada en tubos estériles de eppendorf que contenían 0,3 g de granos de cristal, el tamaño de las partículas oscila de 425 a 600 µm. Para obtener el DNA cromosómico, 0,2 mL de tampón de extracción que contenían el 100 mM Tris- HCl pH 8, 1% SDS, 2 % Triton X-100, 10 mM EDTA, 100mM NaCl fueron agregados más 0,2 mL de fenol: cloroformo:isoamilalcohol con la siguiente proporción 25:24:1. Las fracciones solubles conteniendo DNA fueron purificados según procedimientos estándares (Sambrook *et al.*, 1989). La secuencia parcial de los genes del rDNA nuclear y de la región ribosomal 22S del espaciador fue amplificada usando los primers (Gardes y Bruns, 1993): ITS1 – F(5' – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A- 3') y LR3 (5' –GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3). Para el dominio D1/D2, los primers usados fueron F63 (5' –GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG -3'), también llamado CTB6 y NL4 respectivamente (Altschul *et al.*, 1997). Las reacciones de PCR fueron realizados en un sistema para PCR Gene Amp 9700. Para los primers ITS1 y NL4, el procedimiento de PCR dio una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos seguidos por 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 60s), extensión inicial (55°C, 60 S), la extensión media (70°C, 60S) y una extensión final a 72°C por 7 minutos. La amplificación de el dominio D1/D2, las condiciones de amplificación se dio una desnaturalización inicial 94 °C por 3 minutos seguidos por 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 60s), la extensión (72°C) y una extensión final 72 °C por 7 minutos. Los controles negativos (excepto la cadena de DNA) fueron incluidos en cada reacción para no asegurar ninguna contaminación en materiales experimentales.

Los productos de PCR fueron purificados con un equipo de gel de extracción Kit (Cat.N. 28704 Qiagen). La secuenciación del DNA de ambas cadenas fueron realizados el método de terminación de cadena del dideoxy con un analizador ABI prism 3100 DNA y el ABI Prism Big Dye reacción terminal en el ciclo de lectura de secuencias del equipo (Biosistemas Aplicados) (ver anexo 7).

RESULTADOS

9.1 Efecto del Filtrado Obtenido en Condiciones no Agitadas de la Cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre el Crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*

El filtrado amarillo obtenido del tiempo 56 en cultivos en batch de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 fue evaluado al cabo de 10 días de incubación por el método de dilución en placa. Se procedió a la medición diaria del crecimiento del frente hifal de la colonia. Las Figuras 9 y 10 muestran el crecimiento del frente hifal en función del tiempo de *Botrytis cinerea* y de *Alternaria solani*, respectivamente, con o sin la adición del filtrado obtenido de los cultivos en batch de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD-1. La velocidad de crecimiento específico del hongo en tratamiento con el filtrado amarillo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre *Botrytis cinerea* es menor (0,6 cm/h) que la observada en el tratamiento del filtrado amarillo sobre *Alternaria solani* (0,7 cm/h). Se puede evidenciar que el crecimiento en los dos tratamientos tanto para *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* presento una ligera variación presentado un porcentaje de inhibición del crecimiento de 80 y 61%, respectivamente.

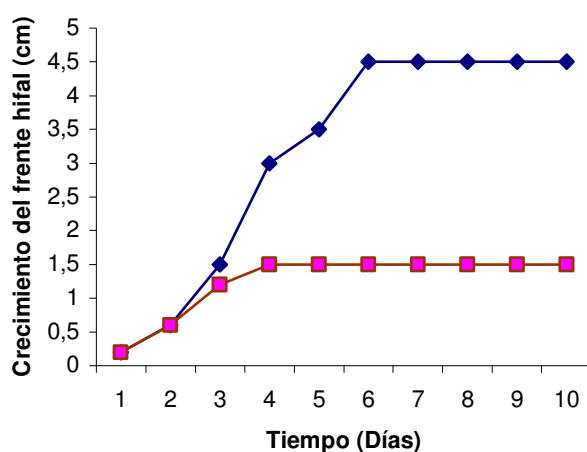


Figura 9. Curva de crecimiento del frente hifal de la cepa *Botrytis cinerea* C- = Control negativo (Crecimiento de *Botrytis cinerea*) y T+ = Crecimiento de *Botrytis cinerea* en el medio de cultivo homogenizado con el filtrado obtenido de los cultivos en batch de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1.

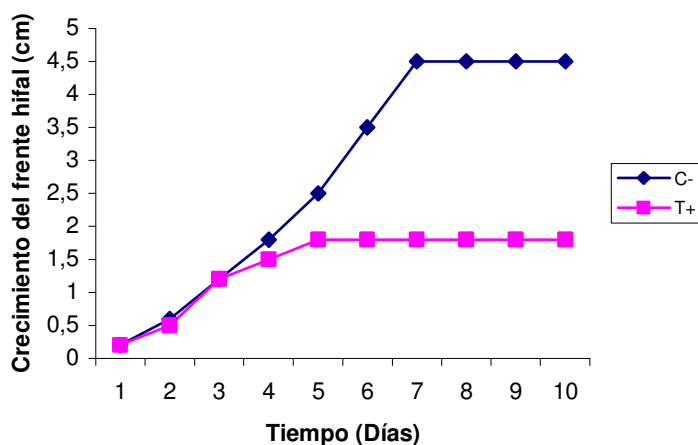


Figura 10. Curva de crecimiento del frente hifal de la cepa *Alternaria solani* C- = Control negativo (Crecimiento de *Alternaria solani*) y T+ = Crecimiento de *Alternaria solani* en el medio de cultivo homogenizado con el filtrado obtenido de los cultivos en batch de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1.

Para analizar si existen diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó el análisis de varianza de un solo factor al 95% de confianza. Evidenciando diferencias entre tratamientos, donde el tratamiento con el filtrado amarillo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 actúa de manera distinta sobre *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* en relación a los otros tratamientos (ver anexo 8). Aunque las condiciones de cultivo mantuvieron las mismas características de temperatura, iluminación y concentración de sustrato, los resultados muestran diferencias entre las actividades presentadas por los filtrados obtenidos de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*.

9.2 Prueba de Toxicidad

Como se observa en la Figura 11, el filtrado amarillo (cepa *Trichoderma* sp. Bol 12 QD-1) con una concentración de 7,5 mg/mL presenta actividad inhibitoria sobre *Botrytis cinerea* (a). Además de no ser tóxico ni dañino para la planta, comparando con la actividad del fungicida químico (Mancozeb) a una concentración de 0,009 mg/mL (b) y (c), el cual presenta efectos secundarios sobre la hoja de haba, además de no presentar actividad a esta concentración.

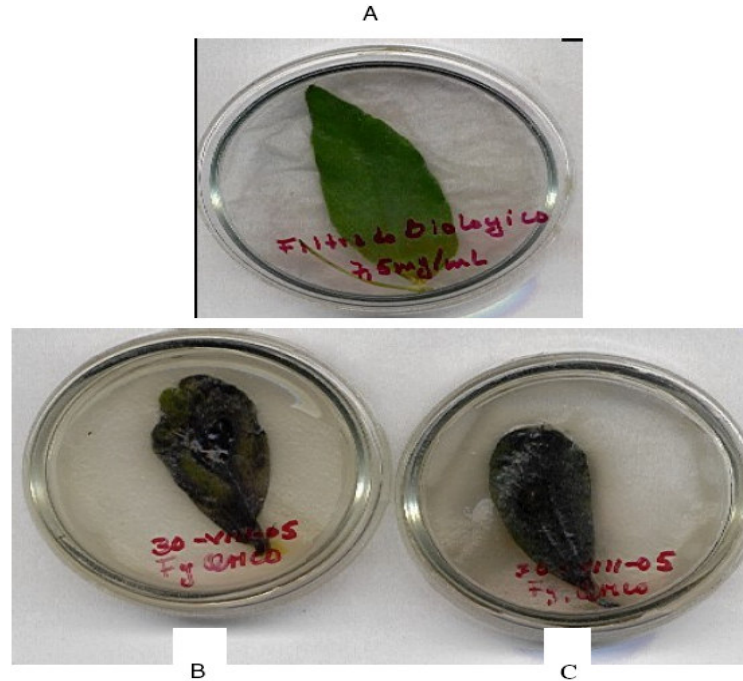


Figura 11. Bioensayo en gota. A= El filtrado amarillo a una concentración de 7,5mg/mL no presenta efectos secundarios sobre la hoja y además de presentar actividad inhibitoria sobre *Botrytis cinerea* B= fungicida químico a una concentración de 0,01 mg/mL no presenta actividad sobre *B.cinerea* C= fungicida químico a una concentración de 0,01 mg/mL no presenta actividad sobre *Alternaria solani* y además de presentar efectos secundarios.

9.3 Pruebas en Invernadero

9.3.1 Control de *Botrytis cinerea*

A continuación se observa el control de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* tomando en cuenta las características morfológicas (número de plantas atacadas, sanas y germinadas). Los resultados expresados como promedio de porcentajes durante el tiempo de experimentación (30 días) son detallados en las Figuras 12 y 13.

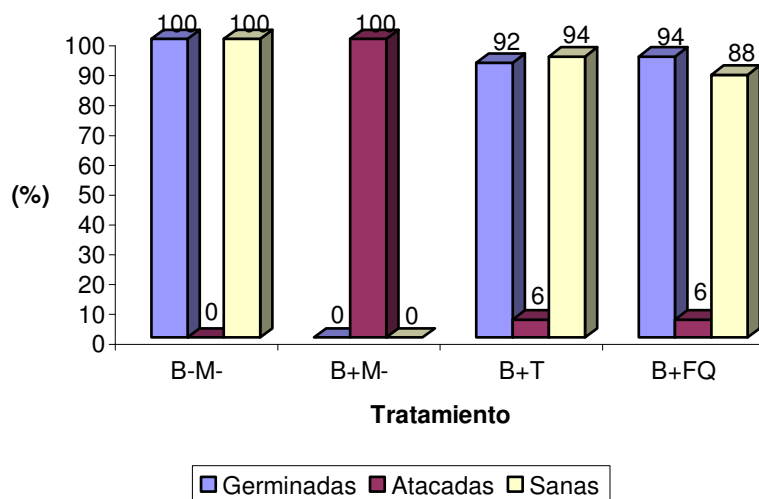


Figura 12. Porcentaje de supervivencia de *Botrytis cinerea* por efecto del filtrado de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 en plantulas de haba. Evaluaciones realizadas durante 1 mes. (B-M-)= Testigo blanco; B+M-= Aplicación de *Botrytis cinerea* (B+) sin el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (M-); B+FQ= Aplicación de *Botrytis cinerea* (B+) con la aplicación del fungicida químico (FQ); B+T= Aplicación de *Botrytis cinerea* (B+) con el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (T).

Para analizar si existen diferencias significativas entre las plantas que hayan sido **atacadas** por cada tratamiento se utilizó el análisis de varianza de un factor detallada en la Tabla 6.

Hipótesis:

Ho: No existe diferencia entre los tratamientos

H1: Existe diferencia entre los tratamientos.

Significancia = 0,05

Tabla 6. Análisis de varianza de un factor en plantas atacadas para el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de Cuadrados Medios	Fo	P Tabulado
Entre tratamientos	20,371	2	10,1855	6,552*	0,018
Dentro del tratamiento	59,90	31	1,9322		
Total	80,271	33			

*Todos los tratamientos son significativamente diferentes

Existen diferencias significativas entre las plantas que hayan sido atacadas para cada tratamiento.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si, se realizo el test de Duncan (Tabla 7).

Tabla 7. Prueba de Duncan en plantas atacadas para el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Tratamiento	Valor Medio	Duncan
B-M-	66.6	A
B+M-	33.3	B
B+T	64	AC
B+FQ	62.6	CD

Para analizar si existén diferencias significativas entre las plantas que hayan **contrarrestadas** por cada tratamiento se utilizó el análisis de varianza de un factor. Detallada en la Tabla 8.

Hipótesis:

Ho: No existe diferencia entre los tratamientos

H1: Existe diferencia entre los tratamientos.

Significancia = 0,05

Tabla 8. Análisis de varianza de un factor en plantas contrarrestadas para el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de Cuadrados Medios	Fo	P Tabulado
Entre tratamientos	30,831	2	15,4155	8,562*	0,042
Dentro del tratamiento	65,90	31	2,1258		
Total	80,271	33			

*Todos los tratamientos son significativamente diferentes

Existen diferencias significativas entre las plantas que hayan sido **contrarrestadas** por cada tratamiento.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si, se realizo el test de Duncan (Tabla 9).

Tabla 9. Prueba de Duncan en plantas contrarrestadas para el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Tratamiento	Valor Medio	Duncan
B-M-	0.0	A
B+M-	1.0	B
B+T	0.8	A
B+FQ	0.6	A

9.3.2 Control de *Alternaria solani*

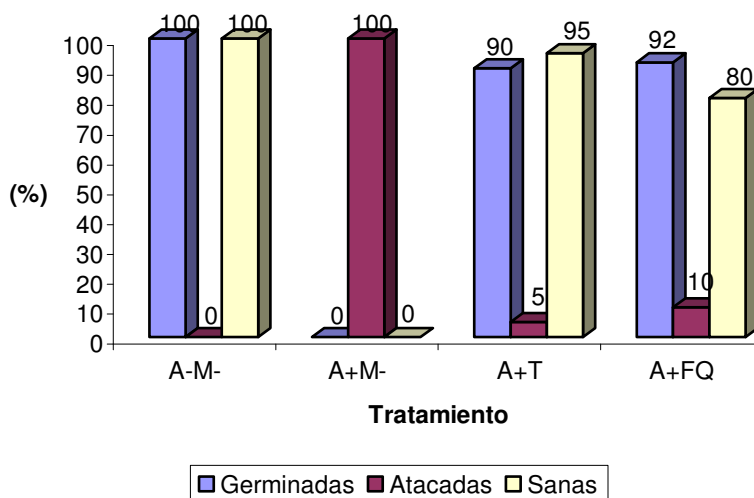


Figura 13. Porcentaje de supervivencia de *Alternaria solani* por efecto del filtrado de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 en plantulas de haba. Evaluaciones realizadas durante 1 mes. (A-M-)= Testigo blanco; A+M-= Aplicación de *Alternaria solani* (A+) sin el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (M-); A+FQ= Aplicación de *Alternaria solani* (A+) con la aplicación del fungicida químico (FQ); A+T= Aplicación de *Botrytis cinerea* (A+) con el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (T).

Para analizar si existe diferencia significativa entre las plantas que hayan sido **atacadas** por cada tratamiento se utilizó análisis de varianza de un factor. Detalladas en la Tabla 10.

Hipótesis:

Ho: No existe diferencia entre los tratamientos

H1: Existe diferencia entre los tratamientos.

Significancia = 0,05

Tabla 10. Análisis de varianza de un factor en plantas atacadas para el tratamiento de *Alternaria solani*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de Cuadrados Medios	Fo	P Tabulado
Entre tratamientos	18,371	2	9,1875	6,017*	0,012
Dentro del tratamiento	57,90	31	1,8677		
Total	76,271	33			

*Todos los tratamientos son significativamente diferentes

Existen diferencias significativas entre las plantas que hayan sido **atacadas** para cada tratamiento.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si, se realizo el test de Duncan (Tabla 11).

Tabla 11. Prueba de Duncan en plantas atacadas para el tratamiento de *Alternaria solani*

Tratamiento	Valor Medio	Duncan
A-M-	66.6	A
A+M-	33.3	B
A+T	63.3	AC
A+FQ	60.6	CD

Para analizar si existe diferencia significativa entre las plantas que hayan sido **contrarrestadas** por cada tratamiento se utilizó análisis de varianza de un factor, detalladas en la Tabla 12.

Hipótesis:

Ho: No existe diferencia entre los tratamientos

H1: Existe diferencia entre los tratamientos.

Significancia = 0,05

Tabla 12. Análisis de varianza de un factor en plantas contrarrestadas para el análisis de *Alternaria solani*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de Cuadrados Medios	Fo	P Tabulado
Entre tratamientos	27,621	2	13,8105	6,863*	0,022
Dentro del tratamiento	62,95	31	2,0306		
Total	90,571	33			

*Todos los tratamientos son significativamente diferentes

Existen diferencias entre las plantas que hayan sido **contrarrestadas** por cada tratamiento.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si, se realizo el test de Duncan (Tabla 13).

Tabla 13. Prueba de Duncan en plantas contrarrestadas para el tratamiento de *Alternaria solani*

Tratamiento	Valor Medio	Duncan
A-M-	0.0	A
A+M-	1.0	B
A+T	0.7	A
A+FQ	0.5	A

9.3.3 Evaluación de las Variables de Estudio

9.3.3.1 Longitud de las Plántulas

Las Tablas 14 y 18 muestran la relación de longitud de altura de plántulas expresadas en promedios a diferentes tiempos de experimentación.

Tabla 14. Longitud de las plántulas a tres tiempos en pruebas de invernadero

Longitud promedio de tallo (cm)			
Tratamiento	7 días	14 días	30 días
B-M-	3,89	8,00	20,43
B+M-	2,67	5,00	0,00
B+T	3,40	8,01	25,20
B+FQ	3	6,5	15

Para analizar si el tamaño de la planta es igual en el tiempo, el tamaño de las plantas son iguales en cada tratamiento, además si el tiempo conjuntamente con el tratamiento influyen en el tamaño de la planta para contrastar las hipótesis que nos estamos planteando se utilizó un análisis de factores (tiempo y tratamiento). Datos detallados tanto para *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* en la Tabla 15 y 19 respectivamente. Este análisis y la formulación de hipótesis se realizó tanto para los tratamientos con *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*.

Hipótesis 1:

Ho: El tamaño de la planta es igual en cada tiempo

H1: El tamaño de la planta es diferente en cada tiempo.

Hipótesis 2:

Ho: El tamaño de la planta es igual en cada tratamiento.

H1: El tamaño de la planta es diferente en cada tratamiento.

Hipótesis 3:

Ho: El tiempo y el tratamiento no influyen en el tamaño de la planta

H1: El tiempo y el tratamiento incluyen en el tamaño de la planta

Significancia = 0,05

Tabla 15. Análisis de varianza para dos factores (tiempo y tratamiento) en el control de *Botrytis cinerea*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Fo	P Tabulado
Tiempo	2.455,67	2	1.227,835	2069,5	0,00**
Tratamientos	186,202	2	93,101	52,314	0,00**
Tiempo y tratamiento	188,874	4	47,2185	26,533	0,00**
Error	112,118	97	1,1558		
Total	2.942,863	105			

**Existe diferencias altamente significativas entre los tiempos, los tratamientos y que el tiempo conjuntamente con el tratamiento influyen en el tamaño de las plantas.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si según el tiempo y tratamientos (Tabla 16 y 17), se realizo el test de Duncan.

Tabla 16. Prueba de Duncan según el tiempo en el control de *Botrytis cinerea*

Tiempo	Valor Medio	Duncan
7 días	3.24	A
14 días	6.8775	B
30 días	15.1575	C

Tabla 17. Prueba de Duncan según el tratamiento en el control de *Botrytis cinerea*

Tratamientos	Valor Medio	Duncan
B-M-	7.7737	A
B+M-	2.9687	B
B+T	7.8890	A
B+FQ	6.2997	AC

Tabla 18. Longitud de las plántulas a tres tiempos en pruebas de invernadero por efecto del filtrado del tiempo 56 de la cepa Bol *Trichoderma inhamatum* 12 QD-1 sobre *Alternaria solani*

Longitud promedio de tallo (cm)			
Tratamiento	7 días	14 días	30 días
A-M-	3,89	8,00	11,43
A+M-	2,65	0,00	0,00
A+T	3,67	8,25	11,76
A+FQ	3,40	8,01	11,20

Tabla 19. Análisis de dos factores (tiempo y tratamiento) para el control de *Alternaria solani*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Fo	P Tabulado
Tiempo	2.355,67	2	1.177,835	2075,5	0,00**
Tratamientos	176,204	2	88,102	51,342	0,00**
Tiempo y tratamiento	185,876	4	46,469	25,544	0,00**
Error	238,117	97	2,4548		
Total	2.955,867	105			

**Existe diferencias entre los tiempos, los tratamientos y que el tiempo con juntamente con el tratamiento influyen en el tamaño de las plantas.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si según el tiempo y tratamientos (Tabla 20 y 21), se realizo el test de Duncan.

Tabla 20. Prueba de Duncan según el tiempo en el control de *Alternaria solani*

Tiempo	Valor Medio	Duncan
7 días	3.4025	A
14 días	6.065	B
30 días	8.5975	BC

Tabla 21. Prueba de Duncan según el tratamiento en el control de *Alternaria solani*

Tratamientos	Valor Medio	Duncan
B-M-	7.7512	A
B+M-	2.9687	B
B+T	6.8890	A
B+FQ	6.2997	AC

9.3.2 Peso Fresco

En las Figura 14 y 15 se muestran los promedios de la evaluación del peso fresco de las plántulas al término del tratamiento tanto para *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* respectivamente.

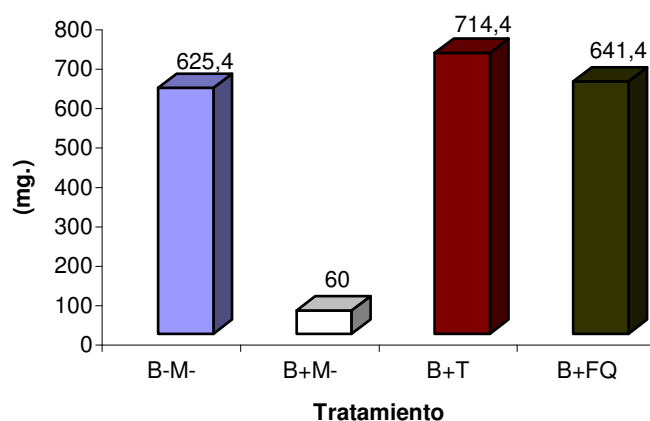


Fig. 14. Frecuencia del peso fresco en mg por cada tratamiento. Evaluaciones realizadas durante 1 mes. (B-M-)= Testigo blanco; B+M-= Aplicación de *Botrytis cinerea* (B+) sin el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (M-); B+FQ= Aplicación de *Botrytis cinerea* (B+) con la aplicación del fungicida químico (FQ); B+T= Aplicación de *Botrytis cinerea* (B+) con el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (T).

Para analizar si existe diferencia significativa entre los pesos de las plántulas se utilizó el análisis de varianza de un factor así también las hipótesis formuladas. Análisis detallado en la tabla 22.

Hipótesis: Ho: El peso fresco es igual en todos los tratamientos

H1: El peso fresco es diferente en todos los tratamientos

Significancia = 0,05

Tabla 22. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	Fo	Sig.
Entre tratamientos	114.002,9	2	57.001,45	49,942	0.00
Dentro del tratamiento	10.652,56	14	760.892,8571		
Total	124.655,5	16			

Como $0.00 < 0.05$ entonces quiere decir que existe diferencia entre el peso fresco por cada tratamiento.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si, se realizo el test de Duncan (Tabla 23).

Tabla 23. Prueba de Duncan para peso fresco en el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Tratamientos	Valor medio	Duncan
B-M-	625.4	A
B+M-	60.0	B
B+T	714.4	C
B+FQ	641.4	D

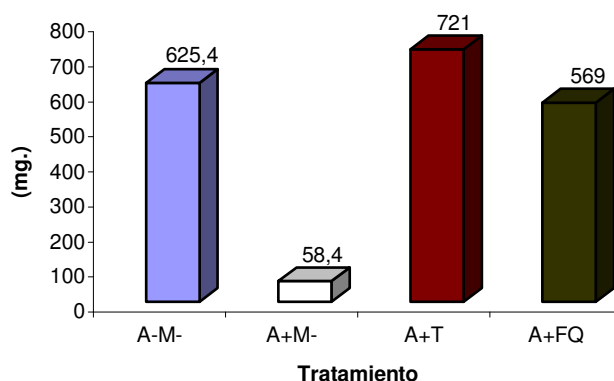


Fig. 15. Frecuencia del peso fresco en mg por cada tratamiento. Evaluaciones realizadas durante 1 mes. (A-M-)= Testigo blanco; A+M-= Aplicación de *Botrytis cinerea* (A+) sin el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (M-); A+FQ= Aplicación de *Botrytis cinerea* (B+) con la aplicación del fungicida químico (FQ); A+T= Aplicación de *Botrytis cinerea* (B+) con el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (T).

Para analizar si existe diferencia significativa entre los pesos de las plántulas en cada tratamiento se utilizó el análisis de varianza de un factor. Datos que se detallan en la Tabla 24.

Hipótesis:

Ho: El peso fresco es igual en todos los tratamientos

H1: El peso fresco es diferente en todos los tratamientos

Significancia = 0,05

Tabla 24. Análisis de varianza de un factor para el tratamiento de *Alternaria solani*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	Fo	Sig.
Entre tratamientos	12.405,30	2	6.202,65	53,667	0,00
Dentro del tratamiento	1.175.368	14	8.395.485,7		
Total	13.58066,8	16			

Como $0.00 < 0.05$ entonces quiere decir que existe diferencia entre el peso fresco por cada tratamiento.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si, se realizo el test de Duncan (Tabla 25).

Tabla 25. Prueba de Duncan para peso fresco en el tratamiento de *Alternaria solani*

Tratamientos	Valor medio	Duncan
A-M-	625.4	A
A+M-	58.4	B
A+T	721	C
A+FQ	569	D

9.3.3 Peso Seco

En las Figuras 16 y 17 se muestran los promedios de la evaluación del peso fresco de las plántulas al término del tratamiento tanto para *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* respectivamente.

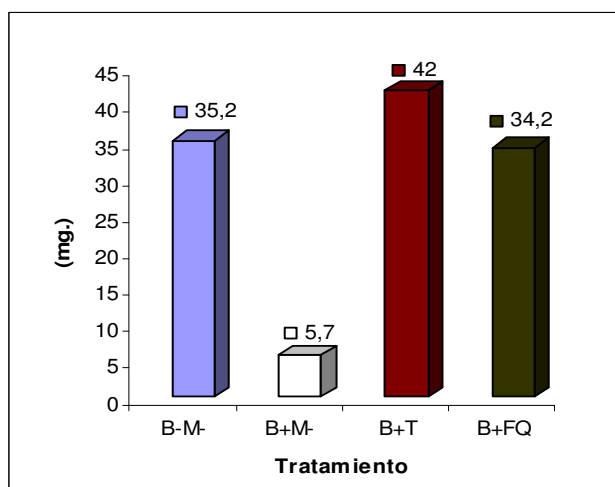


Figura 16. Frecuencia del peso seco en mg por cada tratamiento. Evaluaciones realizadas durante 1 mes. (B-M-)= Testigo blanco; B+M-= Aplicación de *Alternaria solani* (B+) sin el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (M-); B+FQ= Aplicación de *Alternaria solani* (B+) con la aplicación del fungicida químico (FQ); B+T= Aplicación de *Alternaria solani* (A+) con el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (T).

Para analizar si existe diferencia significativa entre los pesos secos de las plantas en cada tratamiento se utilizó el análisis de varianza de un factor. Datos detallados en la tabla 26.

Hipótesis:

Ho: El peso seco es igual en todos los tratamientos

H1: El peso seco es diferente en todos los tratamientos

Utilizando un nivel de significancia = 0,05

Tabla 26. Análisis de varianza de un factor (peso seco) para el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	Fo	Sig.
Entre tratamientos	1778,267	2	889,1335	15,663	0,00
Dentro del tratamiento	636,392	14	45,4565		
Total	2414,659	16			

Como $0.00 < 0.05$ entonces quiere decir que existe diferencia entre el peso seco por cada tratamiento.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si, se realizo el test de Duncan (Tabla 27).

Tabla 27. Prueba de Duncan para peso seco en el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Tratamientos	Valor medio	Duncan
B-M-	35.2	A
B+M-	5.7	B
B+T	42	C
B+FQ	34.2	A

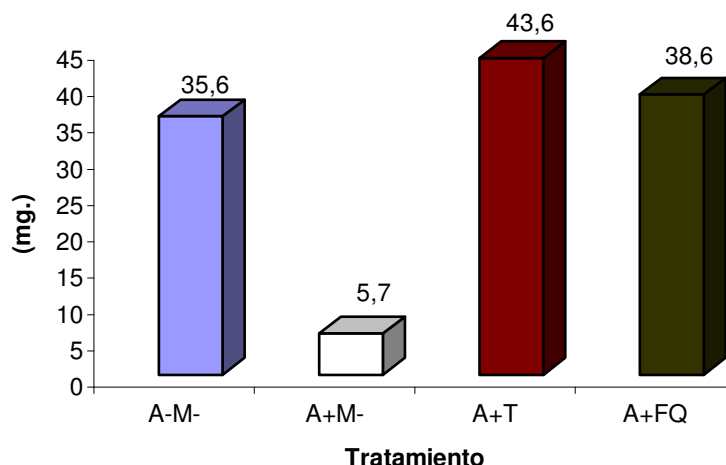


Figura 17. Frecuencia del peso seco en mg por cada tratamiento. Evaluaciones realizadas durante 1 mes. (A-M-)= Testigo blanco; A+M-= Aplicación de *Alternaria solani* (A+) sin el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (M-); A+FQ= Aplicación de *Alternaria solani* (A+) con la aplicación del fungicida químico (FQ); A+T= Aplicación de *Alternaria solani* (A+) con el filtrado de *Trichoderma inhamatum* (T).

Para analizar si existe diferencia significativa entre los pesos secos de las plantas en cada tratamiento se utilizó el análisis de varianza de un factor. Datos que se detallan en la tabla 28.

Hipótesis:

- Ho: El peso seco es igual en todos los tratamientos
 - H1: El peso seco es diferente en todos los tratamientos
- Utilizando un nivel de significancia = 0,05

Tabla 28. Análisis de varianza de un factor (peso seco) para el tratamiento de *Alternaria solani*

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	Fo	Sig.
Entre tratamientos	1.878,627	2	939,3135	13,563	0,00
Dentro del tratamiento	646,392	14	323,196		
Total	2.525,019	16			

Como $0.00 < 0.05$ entonces quiere decir que existe diferencia entre el peso seco por cada tratamiento.

Para formar grupos de medias similares o diferentes entre si, se realizo el test de Duncan (Tabla 29).

Tabla 29. Prueba de Duncan para peso seco en el tratamiento de *Alternaria solani*

Tratamientos	Valor medio	Duncan
A-M-	35.6	A
A+M-	5.7	B
A+T	43.6	C
A+FQ	38.6	AD

9.4 Estudios Cromatográficos

9.4.1 Rendimiento de las fracciones

El extracto obtenido de la fermentación de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 fue fraccionado por cromatografía en columna en fase reversa CCRP18 eluido con solventes de polaridad creciente, primeramente con agua y metanol 60/40, luego con agua y metanol 40/60 y por último metanol 100% obteniéndose los siguientes porcentajes de rendimiento (Tabla 30).

Tabla 30. Recuperación de las fracciones de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1

Código	Peso extracto (mg)	Peso fracciones (mg)	Rendimiento %
A:H2O/MeOH 60/40	289,0	118,8	41,11
B: H2O/MeOH 40/60	289,0	106,1	36,71
C: MeOH -100	289,0	59,0	20,4

El porcentaje de recuperación que se observa es muy evidente para la fracción A, la cual representa un 41,11% que es el rendimiento más alto de todas las fracciones del extracto de *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1. Es importante hacer notar que la fracción A corresponde al pigmento amarillo puro que fue obtenida con **H₂O/MeOH 60/40**. Se obtuvo el espectro de la fracción amarilla obtenido de la mezcla H₂O/MeOH: 60/40 (Figura 18).

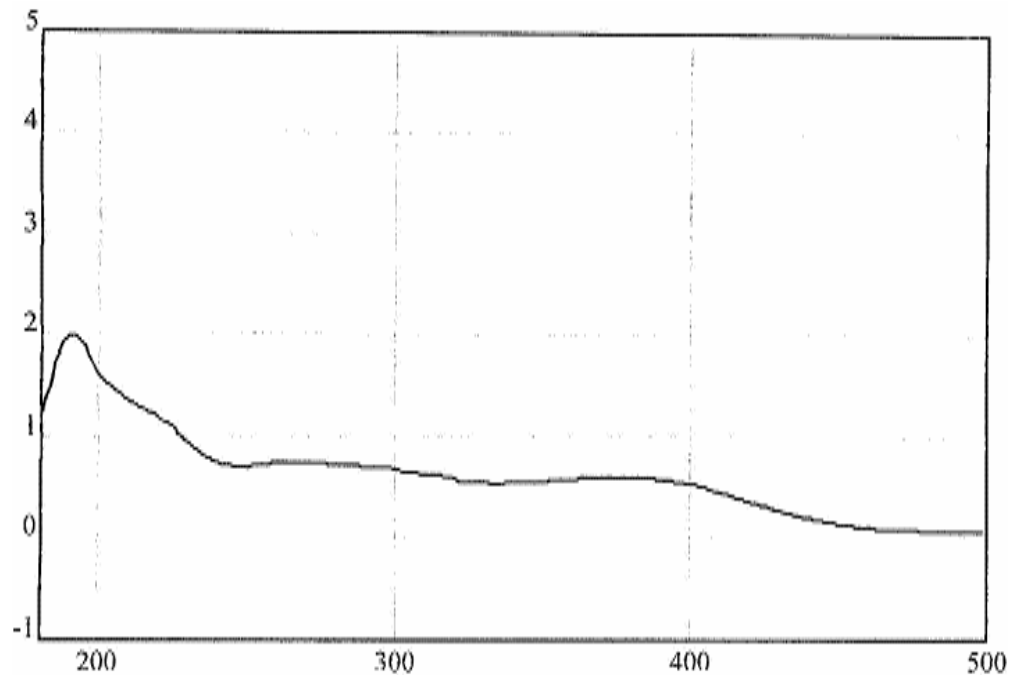


Figura 18. Espectro de la fracción amarilla (H₂O/MeOH: 60/40) obtenido de filtrado de cultivo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1

Una vez obtenido los rendimientos se evaluaron las diferentes fracciones contra hongos y parásitos los resultados son reportados a continuación.

9.4.2 Resultados de la Actividad Biológica

9.4.2.1 Evaluación Antifúngica y Parasitaria de los Fracciones Obtenidas de la *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 en Placas de 24 Pozos (Mitscher)

Las fracciones obtenidas por cromatografía en columna fase reversa CCRP18 (H₂O:MeOH - 40:60) amarilla, (H₂O:MeOH - 60:40) amarilla y (MeOH -100%) roja fueron evaluados por la prueba antifúngica contra *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea* (Figura 19)

presentando la fracción amarilla (H₂O:MeOH – 40:60) actividad a una concentración de 3,75mg/mL asimismo en la prueba antiparasitaria presento un IC 50 de 21.8 µg/mL contra *Leishmania PH8*, 19,5ug/mL frente a *Leishmania M2903*, 19,5 µg/mL frente a *Leishmania PP75* y frente a *T.cruzi 10,4*. No siendo activos las fracciones obtenidas por H₂O : MeOH – 60:40 y MeOH –100%. La actividad de los extractos obtenidos fueron evaluados biológicamente los resultados se reportan en las Tablas 31 y 32.

Tabla 31. Actividad antifúngica de la fracciones aisladas de *Trichoderma inhamatum* Bol 12QD-1 contra *Botrytis cinerea*

<i>Botrytis cinerea</i> (mg/ml)					
	7,5	3,75	1,87	0,93	0,47
Fracción Amarilla (H ₂ O:MeOH – 40:60)	+	+	-	-	-
Fracción Amarilla (H ₂ O:MeOH – 60:40)	-	-	-	-	-
Fracción Roja MeOH 100%	-	-	-	-	-

(+) = Inhibición del desarrollo; (-) = Desarrollo del microorganismo

Tabla 32. Actividad antifúngica de la fracciones aisladas de *Trichoderma inhamatum* Bol 12QD-1 contra *Alternaria solani*

<i>Alternaria solani</i> (mg/ml)					
	7,5	3,75	1,87	0,93	0,47
Fracción Amarilla (H ₂ O: MeOH – 40:60)	+	+	-	-	-
Fracción Amarilla (H ₂ O: MeOH – 60:40)	-	-	-	-	-
Fracción Roja MeOH 100%	-	-	-	-	-

(+) = Inhibición del desarrollo; (-) = desarrollo del microorganismo



Figura 19. Evaluación de los extractos obtenidos de *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre el crecimiento de **A** = *Botrytis cinerea* y **B** = *Alternaria solani* a diferentes concentraciones $1/2 = 7,5\text{mg/mL}$; $1/4 = 3,75\text{mg/mL}$; $1/8 = 1,87 \text{ mg/ml}$; $1/16 = 0,93$; $1/32 = 0,47\text{mg/mL}$. **A** : C (-) A= Control negativo de *Alternaria solani*; C (+) Control positivo de *Alternaria solani*; **B**: C (-) B.c = Control negativo de *Botrytis cinerea*; C(+)*B.c* = Control positivo de *Botrytis cinerea*; R= Efecto de la fracción Amarilla (H_2O : MeOH – 40:60) sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* respectivamente; S= Efecto de la fracción Amarilla (H_2O : MeOH – 40:60) sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* respectivamente; P = Efecto de la fracción Amarilla (H_2O : MeOH – 40:60) sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*, respectivamente.

En la prueba antifúngica en la Tabla 31 y 32 se puede observar que la fracción amarilla presenta actividad hasta $3,75 \text{ mg/mL}$ contra *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* en cambio no presentan actividad las fracciones obtenidas por las mezclas H_2O : MeOH - 60:40 y MeOH 100%. De acuerdo a los resultados de los estudios biodirigidos, es importante recalcar la actividad inhibitoria del pigmento amarillo obtenido de los filtrados de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1. Como se observa en la Tabla 33, donde el pigmento amarillo es efectivo.

Tabla 33. Actividad antiparasitaria *in vitro* contra forma promastigote de Leishmania y epimastigotes de *Tripanosoma cruzi* de las fracciones aisladas de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1

Fracciones	<i>L. PH8</i>	<i>L.M2903</i>	<i>L.PP75</i>	CHAGAS IC 50 ug/mL epimastigotes
Fracción Amarilla (H ₂ O: MeOH - 40:60)	19,6	16,4	19,5	10,4
Fracción Amarilla (H ₂ O: MeOH - 60:40)	66,1	66,1	58,3	-
Fracción Roja MeOH 100%	63,2	53,2	63,9	-

Los controles positivos = Anfotericina IC 50 0,2 ug/mL; Pentamidina IC50 10 tg/mL

En la prueba antiparasitaria (Tabla 33) se observa que frente a las tres cepas de leishmania *L. PH8*, *L. M2903*, *L.PP75* y epimastigotes de *T.cruzi*, la fracción amarilla presenta mayor actividad en relación a las otras fracciones, así también se observa que estas no presentan actividad contra *T.cruzi*.

9.4.3 Presencia de Metabolitos Activos

Con el empleo de las técnicas cromatográficas, y con el reactivo revelador Dragendorf se realizó la determinación de metabolitos activos obteniendo los siguientes resultados: La corrida cromatográfica de la fracción amarilla obtenida mediante la fase móvil H₂O/MeOH - 60/40 reveló la presencia de 6 bandas claras (Figura 20).

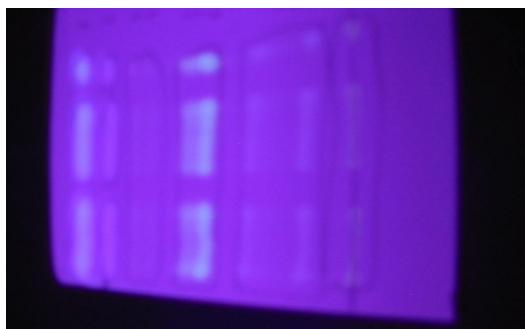


Figura 20. Separación de metabolitos activos de la fracción amarilla (H₂O/MeOH - 60/40) cepa *Trichoderma inhamatum* cepa Bol 12 QD-1 por cromatografía en capa fina.

Muestra: Metabolitos activos extraídos por tratamiento químico

Soporte: Silica gel con fluorescencia UV254 nm de 25 um de espesor con base de aluminio.

Sistema de solventes: Acetato de etilo: metanol a razón de 90:10

9.5 Pruebas en Campo

9.5.1 Efecto de los Extractos Obtenidos de la Cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12QD-1. en el Control de la Mancha Chocolate en Campo

9.5.1.1 Incidencia de la Enfermedad Mancha Chocolate en el Cultivo de Haba

Para la evaluación de incidencia se consideró seis parcelas, distribuidos en cada bloque experimental, dividiendo las parcelas experimentales en 2 grupos (ver anexo 9). El primer grupo consistente en bloque de tres parcelas con cuatro muestreos y otro grupo con tres parcelas con 10 muestreos de tal manera que el cálculo de la incidencia se realizó mediante cuantificación de muestras según la fórmula de Wallen y Jackson (1975), citados por la FAO (1986).

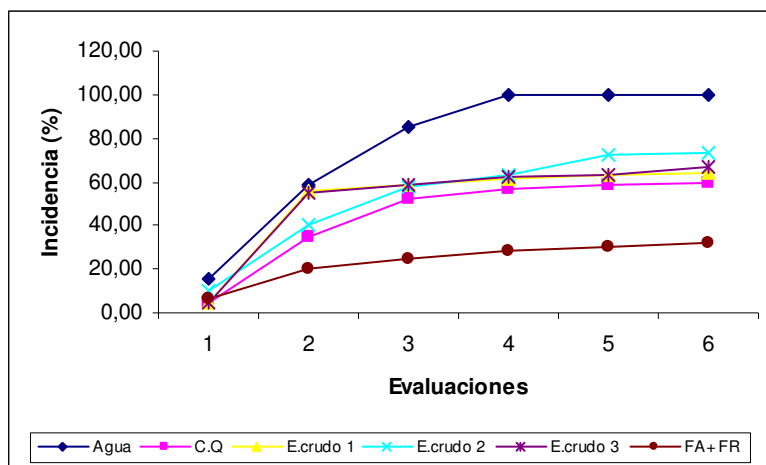


Figura 21. Porcentaje de incidencia del hongo *Botrytis cinerea* en el cultivo de haba. Evaluaciones realizadas durante 5 meses. (FA+FR) = Aplicación de la fracción amarilla con la fracción roja; E. crudo 1, 2y 3 = Aplicación de extractos obtenidos en cultivos en lotes de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1; CQ = Control químico (mancozeb); Agua = Tratamiento con agua natural.

En la Figura 21, se muestra claramente el comportamiento de los seis tratamientos, las seis evaluaciones se realizaron desde la fase de germinación, floración, fructificación

hasta la cosecha. Los periodos de evaluación fueron cada 30 días después de la aplicación de los extractos.

Analizando la Figura 21 se deduce que desde la primera hasta la cuarta evaluación se registro una incidencia gradual en todos los tratamientos de acuerdo al tipo de extracto dosis, excepto el tratamiento con el pigmento fraccionado amarillo mas el filtrado de color rojo (FA+FR) donde a partir de la segunda evaluación se mantiene en un mismo nivel de incidencia, sin embargo el tratamiento con agua reporta el 100% de incidencia de la enfermedad de la mancha chocolate.

9.5.1.2 Severidad de la Enfermedad Mancha Chocolate sobre el Cultivo de Haba

En la Figura 22 se puede establecer claramente la severidad de afección de la enfermedad mancha chocolate en el cultivo de haba, donde el mayor avance de la enfermedad se reporto durante el tercer y cuarto mes aspecto que depende del tipo de extracto y la dosis aplicada.

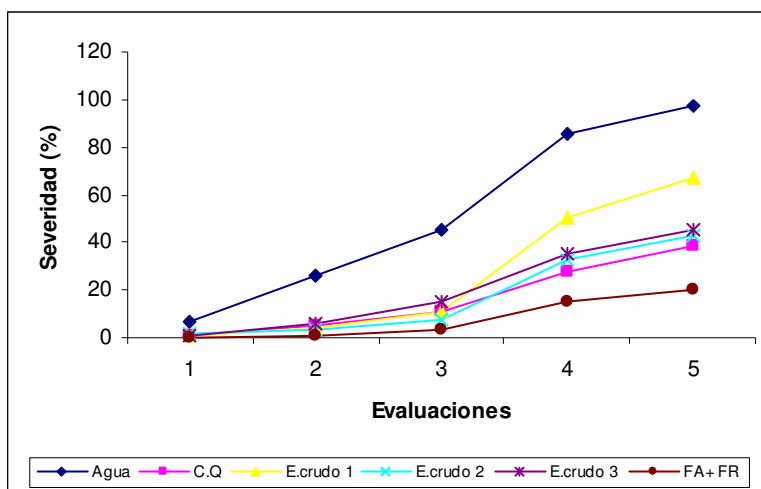


Figura 22. Porcentaje de gravedad de la enfermedad mancha chocolate en el cultivo de haba. Evaluaciones realizadas durante 5 meses. (FA+FR) = Aplicación de la fracción amarilla con la fracción roja; E. crudo 1, 2 y 3 = Aplicación de extractos obtenidos en cultivos en lotes de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1; CQ = Control químico (mancozeb); Agua = Tratamiento con agua natural.

Los tratamientos con mayores índices de gravedad se reportaron en el tratamiento con agua 97%, seguido por el extracto crudo 1 con 67% respectivamente, los cuales demostraron un bajo control de la enfermedad mancha chocolate. Sin embargo los tratamientos: extracto crudo 3 con 45,5%, extracto crudo 2 con 42,4%, fungicida químico

(C.Q) con 38,5% y la fracción amarilla mas el fermento rojo con 20% muestran menores índices de severidad de la enfermedad mancha chocolate, coincidiendo con las evaluaciones de la incidencia (Figura 22), el resto de los tratamientos como se manifestó se encuentra por encima de 50% de severidad demostrando su poca actividad de control de la enfermedad mancha chocolate.

9.5.1.3 Efecto de Dosis de Extractos Utilizados para el Control de la Mancha Chocolate.

Los resultados obtenidos muestran claramente la eficiencia de control de los diferentes tratamientos, cuyo detalle se puede observar en la Figura 23.

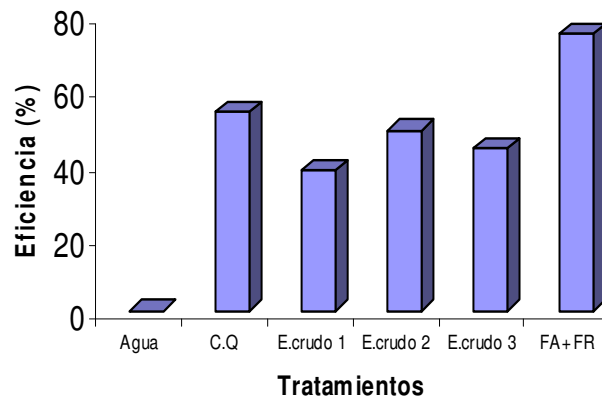


Fig 23. Efecto de dosis de extractos utilizados para el control de la mancha chocolate en cultivo de haba. (FA+FR) =Aplicación de la fracción amarilla con la fracción roja; E. crudo 1, 2 y 3 = Aplicación de extractos obtenidos en cultivos en lotes de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1; CQ = Control químico (mancozeb); Agua = Tratamiento con agua natural.

En la figura 23 se aprecia con mayor detalle la eficiencia de los diferentes tratamientos, donde se puede observar que la fracción amarilla mas el extracto crudo rojo que tiene la dosis mas alta (FA+FR) es más eficiente en el control de la *Botrytis cinerea*, reportando un 75% en relación a los otros tratamientos con dosis menores que tuvieron un comportamiento regular en el control del agente causal de la mancha chocolate.

9.5.2 Efecto en el Rendimiento

9.5.2.1 Número de Vainas por Planta

Los resultados de la aplicación de los diferentes tratamientos en el control de la enfermedad mancha gris con respecto al número de vainas por planta pueden ser apreciados claramente en la Figura 24.

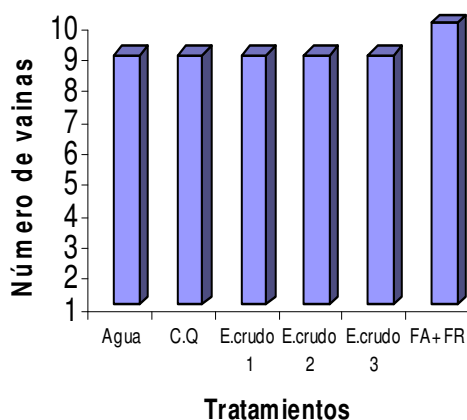


Figura 24. Efecto del producto/dosis sobre el número de vainas por planta. (FA+FR) =Aplicación de la fracción amarilla con la fracción roja; E. crudo 1, 2y 3 = Aplicación de extractos obtenidos en cultivos en lotes de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1; CQ = Control químico (mancozeb); Agua = Tratamiento con agua natural.

Como se observa en la Figura 24, la cantidad de vainas por planta no ha reportado variantes significativas, excepto el tratamiento con la fracción amarilla y la fracción roja (FA+FR) que reporto un promedio de 10 vainas por planta y los otros tratamientos reportaron 9 vainas por planta.

9.5.2.2 Evaluación de la Longitud de Vaina por Planta, Tratamiento Dosis

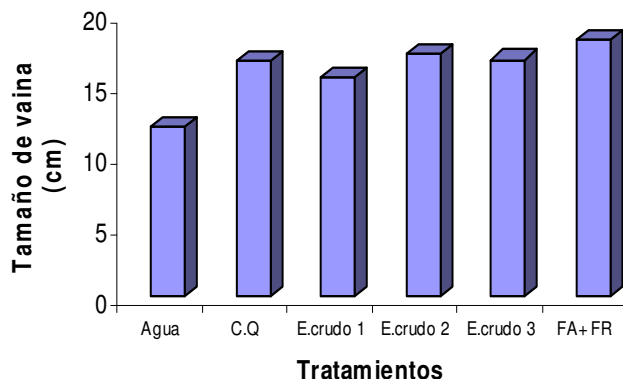


Figura 25. Efecto del producto/ dosis sobre el tamaño de vainas en cm. (FA+FR) =Aplicación de la fracción amarilla con la fracción roja; E. crudo 1, 2 y 3 = Aplicación de extractos obtenidos en cultivos en lotes de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1; CQ = Control químico (mancozeb); Agua = Tratamiento con agua natural.

Como se observa en la Figura 25, las mejores longitudes se reportan cuando la planta ha recibido el tratamiento fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR) con un promedio de 18,1 cm de longitud de vaina en relación a los otros tratamientos con longitudes menores. Por otro lado los tratamientos que reportaron tamaños intermedios de vaina son: E. crudo 3 con 16,75 cm, E.crudo 2 con 17,2 cm, E.crudo 1 con 15,5 y fungicida químico (C.Q) con 16,7. El tratamiento con agua reporto menor tamaño en la longitud de vaina por planta con 12 cm.

9.5.2.3 Peso de 100 Semillas

9.5.2.3.1 Peso de 100 Semillas por Tratamiento en Gramos

En la Figura 26 se muestra los resultados obtenidos con aplicación de extractos y dosis en el control de la enfermedad mancha chocolate.

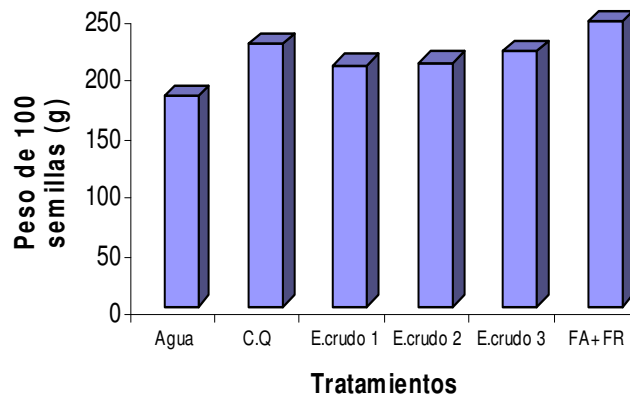


Figura 26. Efecto del producto /dosis sobre el peso de 100 semillas. (FA+FR) =Aplicación de la fracción amarilla con la fracción roja; E. crudo 1, 2 y 3 = Aplicación de extractos obtenidos en cultivos en lotes de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1; C.Q = Control químico (mancozeb); Agua = Tratamiento con agua natural.

Efectuado el control de la enfermedad mancha chocolate con las diferentes dosis de extractos naturales se obtuvieron los siguientes resultados del peso de 100 semillas: en la parcela con el tratamiento agua se obtuvo un promedio de 180,5 g de 100 semillas este tratamiento no tuvo ningún efecto en la variable de peso de 100 semillas, en cambio los otros tratamientos que tuvieron efecto reportaron los siguientes resultados, así por ejemplo el tratamiento fungicida químico (C.Q) con 225,5 g, extracto crudo 1 con 207 g, extracto crudo 2 con 209,5 y extracto crudo 3 con 219,5. Finalmente podemos mencionar que el mejor tratamiento fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR) reporto 244,5 g.

9.5.3 Rendimiento en Vaina

En la Figura 27, se observa detalladamente los resultados promedios obtenidos con la aplicación de extractos naturales en el control de la enfermedad mancha chocolate con respecto al rendimiento en vaina.

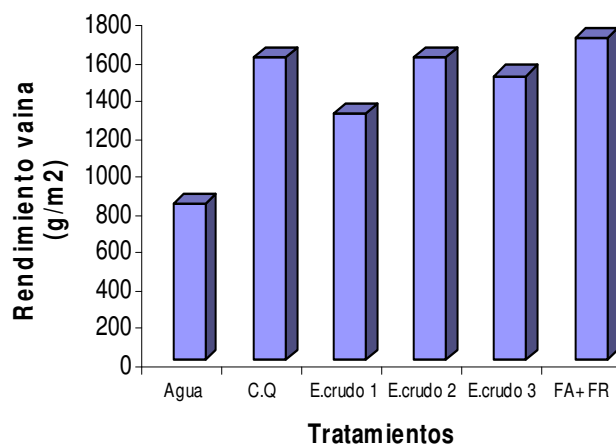


Figura 27. Efecto de los diferentes tratamientos sobre el rendimiento en vaina del cultivo de haba. FA+FR) =Aplicación de la fracción amarilla con la fracción roja; E. crudo 1, 2 y 3 = Aplicación de extractos obtenidos en cultivos en lotes de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1; CQ = Control químico (mancozeb); Agua = Tratamiento con agua natural.

Según la Figura 27 los mayores rendimientos se reportaron en los tratamientos en la fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR) con 1.700 g/m^2 seguido por el fungicida químico y extracto crudo 2 con 1600 g/m^2 respectivamente. Finalmente los rendimientos de los extractos crudos son relativamente inferiores con 1.500 g/m^2 para el extracto crudo 3 y 1.300 g/m^2 para el extracto crudo 1. El tratamiento con agua reporto valores inferiores de rendimiento con 850 g/m^2 .

9.5.4 Rendimiento en Grano Seco

En la Figura 28 se reportan los rendimientos en grano seco de los diferentes tratamientos.

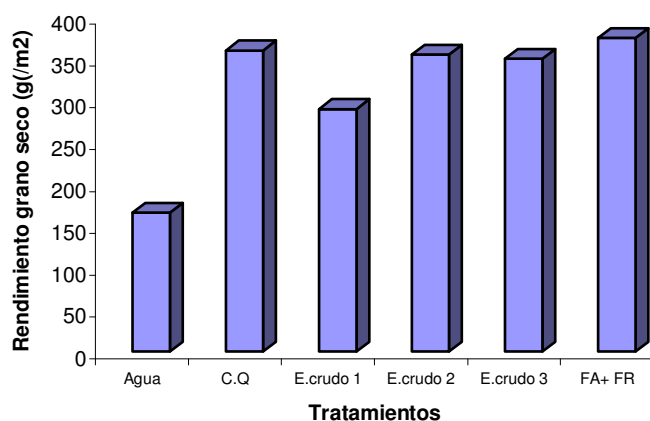


Figura 28. Efecto de los extractos naturales sobre el rendimiento en grano seco. FA+FR) =Aplicación de la fracción amarilla con la fracción roja; E. crudo 1, 2y 3 = Aplicación de extractos obtenidos en cultivos en lotes de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1; CQ = Control químico (mancozeb); Agua = Tratamiento con agua natural.

Se puede observar que similares rendimientos en grano seco se reportan en los tratamientos fracción amarilla mas fracción roja con 375 g/m² fungicida químico con 360 g/m² extracto crudo 3 y 2 reportan 350 g/m² y 355 g/m² respectivamente. Finalmente el tratamiento presenta valores inferiores a los otros tratamientos con 166 g/m².

9.6 Caracterización Filogenética de la Cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1

Realizando la comparación en GenBank databases con especies estrechamente relacionadas, la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 presento elevada homología con la secuencia de *Trichoderma inhamatum* en un 99%. El árbol filogenético obtenido por neighbour joining, mostró que la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 presento estrecha relación con la cepa de comparación *Trichoderma inhamatum* con un 99%, respecto a el cluster denominado por *Hypomyces chlorinigenus* con un 84% (Figura 29). La secuencia rDNA Bol 12 QD-1 fue depositada en el Gen Bank (NCBI), (Colaboración Ph.D Teresa Álvarez y Msc. Laura Mendoza).

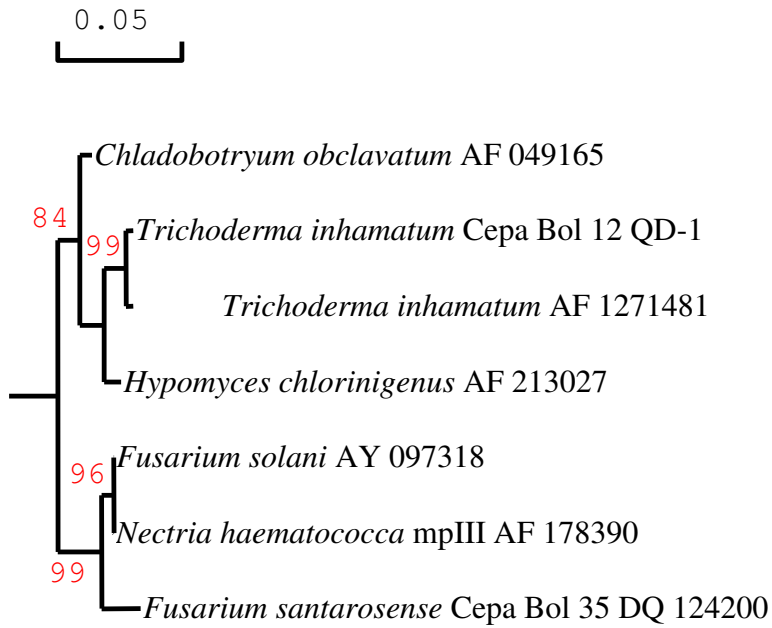


Figura 29. Árbol filogenético ensamblado, basado en la región rDNA - ITS de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 y su relación con las especies. *Fusarium santarosense* Bol 35 QD fue utilizado como un grupo fuera de el árbol filogenético principal. La longitud de la rama es proporcional a la distancia representada por la ocurrencia de barras. Frecuencias en 100 o 500 réplicas de relación se indican en los entrenudos.

DISCUSIONES

10.1 Actividad Biológica Inhibitoria *in vitro* de los Filtrados de Cultivo de Hongos Biocontroladores

Estudios realizados por Alipi y Monaco, *in vitro* deducen que el antagonismo en placa es una prueba inicial muy importante, el cual nos da una aproximación para estudios subsiguientes de sistemas biológicos de control de enfermedades. La forma e intensidad de antagonismo *in vitro* por el método de dilución en placa, es una prueba inicial para poder determinar el tipo de interferencia por las características que presenta dicha prueba, desarrollada con cada una de las pruebas anteriormente citadas (ejemplo: método indirecto de dilución en placa). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se observa diferentes tipos de interferencia según cada combinación patógeno – antagonista, tales como alteraciones en la morfología de las conidias del fitopatógeno que corrobora a los trabajos de Simón *et al.*, 1987.

Como se observa tanto en la Figura 9 y 10 en todos los casos la actividad biológica inhibitoria sobre *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* estuvieron presentes en filtrados de color amarillo provenientes de cultivos de condiciones no agitadas. Lo cual es corroborado por Solís (2004) y Astorga (2004) relacionando el grado de pigmentación de color amarillo con la intensidad de la actividad inhibitoria. Estas observaciones nos inducen a pensar que los pigmentos producidos, posiblemente serían los responsables de conferir la actividad inhibitoria sobre *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*. Así mismo Assante *et al.*, (1981) correlaciono pigmentos amarillos producidos por *Aspergillus flavus* y metabolitos fungicos. Estos pigmentos fueron aislados luego de realizar pruebas *in vitro*. Afirmando que la formación de los pigmentos amarillos en medio diferencial para *Aspergillus* (ADM) esta relacionado a la producción de metabolitos (Ácido aspergillico y neoaspergillico).

Vemos a la vez que los resultados expresados nos dan una idea más general en comparación a la medición del grado de antagonismo, considerando el 100% el crecimiento del hongo fitopatógeno, lo cual demuestra que para los tratamientos con los filtrados obtenidos de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 (99%) presentan un porcentaje de inhibición cercana al 100%. Según Allipi y Mónaco es importante destacar que estos resultados son muy importantes para una evaluación. Y que sería importante extrapolar nuestros resultados a condiciones de invernadero y campo respectivamente. En relación a los medios de cultivo utilizados para la producción de metabolitos secundarios, se utilizó un medio de cultivo casero y económico caldo papa dextrosa (PDA) muy rico en fuentes de carbono. Así mismo, Torrenegra (2002), para la producción de metabolitos secundarios de *Penicillium* sp 28 utilizó medio papa glucosa suplementado con sulfato de amonio, este medio de cultivo es similar al utilizado en nuestro estudio.

Se pudo determinar que el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios por hongos filamentosos no están relacionados en la forma de producirlos, debido a que un hongo puede crecer con nutrientes desnaturalizados o con estructuras complejas; pero para la síntesis de metabolitos secundarios se necesita que los nutrientes no se encuentren alterados en sus propiedades químicas por factores como pH extremos, temperaturas altas, humedad extrema y por reacciones químicas con otros compuestos. Esto debido a que se produce una alteración metabólica de las reacciones primarias para la síntesis del compuesto de interés (Demain, 2000). Esto se comprobó cuando los nutrientes se esterilizaban incorrectamente, lo cual hace que se pierdan sus propiedades físicas y químicas. Lo cual puede hacer que se inhiba la biosíntesis de los metabolitos secundarios en el cultivo (Demain, 2000).

10.2 Prueba de Toxicidad

Se determinó que el filtrado amarillo obtenido de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1, no presenta toxicidad para la planta a una concentración determinada, la cual comparando con la concentración del fungicida químico que se utiliza normalmente para la protección vegetal se observa la producción de necrosis sobre la planta (Figura 11). Este fenómeno podría evidenciar que los fungicidas químicos presentan actividad antifúngica a esta concentración pero producen laceraciones sobre las hojas incidiendo

sobre el rendimiento de la planta lo cual es corroborado por Agosin (1997) en su trabajo realizado sobre pruebas de toxicidad de fungicidas químicos en legumbres.

10.3 Pruebas en Invernadero

En las pruebas de invernadero para los distintos tratamientos, se pudo determinar primeramente las características morfológicas de las plantas, reportando respectivamente el número de plantas atacadas, sanas y germinadas. Observándose al cabo de 30 días que todos los antagonicos contrarrestaron el ataque eficiente a excepción del tratamiento B+M- y A+M- donde a un inicio las semillas apenas germinaban y a la semana morían y en otros casos ni siquiera llegaron a germinar.

Para las Tablas 7 y 10 descrita en los párrafos anteriores se hizo un análisis de varianza de un factor para ver si existe una diferencia significativa entre los tratamientos; esto nos dice que todas han sido atacadas a excepción del tratamiento B-M- y A-M- en comparación al tratamiento B+ M- y A+M- que resultaron totalmente atacadas, sé evaluó entonces que los fitopatógenos atacaron pero en un grado menor a lo esperado.

En el caso de plantas sanas o contrarrestadas donde cada microorganismo actuó de forma diferente, según Agrios 1996 nos determina que existen factores muy importantes tales como la competencia, antibiosis, parasitismo y otros mecanismos de acción.

La prueba de Duncan para los dos casos en tratamientos con plantas atacadas y contrarrestadas, evidencio la formación de grupos estadísticamente diferentes con diferencias significativas en algunos tratamientos y en otros no.

Para evaluar el antagonismo según la longitud a los tres tiempos del ensayo, se puede observar según la Tabla 14 y 18, que el tratamiento B+T y A+T, donde se aplico filtrado de color amarillo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 alcanzo una longitud mayor al cabo de 30 días, esta prueba es corroborada por (Soliz, 2004).

Según el análisis de varianza de dos factores (tiempo y tratamiento) para las tres hipótesis planteadas, se observa que existe una diferencia entre los tiempos y tratamientos. Es decir que los dos factores son decisivos en el crecimiento y desarrollo de la planta. Según

la prueba de Duncan evidencia la formación de grupos estadísticamente diferentes con diferencias significativas entre los tratamientos y frente a otros no existe una diferencia significativa.

En la evaluación del peso fresco hay un mayor peso para las plantas con el tratamiento B+T y A+T, según análisis de varianza de un factor, existe una diferencia significativa por cada tratamiento. Según la prueba de Duncan existe diferencias significativas con algunos tratamientos y con otros no. Para el peso seco vemos que corrobora lo hecho con las evaluaciones del peso fresco.

10.4 Estudios Cromatográficos

Varios métodos cromatográficos han sido usados para la separación y determinación cuantitativa de componentes orgánicos e inorgánicos en microorganismos (Csiktunádi, 2000). El mayor conocimiento del carácter y cantidad de moléculas presentes en microorganismos facilita el entendimiento de los procedimientos bioquímicos que son utilizados en varios procesos biotecnológicos (Muñoz, 1994). Debido a la considerable actividad biológica de compuestos producidos por el género *Trichoderma*, algunos métodos cromatográficos han sido empleados para la separación y cuantificación de estos constituyentes (Csiktunádi, 2000).

Análisis cualitativo y cuantitativo de metabolitos producidos por especies diferentes de *Trichoderma* spp. pueden ser muy importantes para la selección de cepas con actividad biológica (Pezet, 2000). Sin embargo existen pocos estudios, que relacionan la actividad inhibitoria sobre fitopatógenos con compuestos aislados de *Trichoderma* spp.

Por lo mencionado anteriormente, la utilización de cromatografía en columna en el presente estudio, permitió obtener tres fracciones a partir de un sobrenadante de cultivo batch de 950 mL producidos por la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1. Al observar las Tablas 31 y 32 se determinó que la fracción amarilla (MeOH-Agua: 60/40) presentó mayor intensidad de actividad inhibitoria sobre los fitopatógenos (*Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*) y parásitos (*Tripanozoma cruzi* y las tres cepas de *Leishmania*). Estos datos de actividad inhibitoria sobre los fitopatógenos son corroborados por los resultados obtenidos en invernadero.

Los datos de inhibición micelial *in vitro* sobre *Botrytis cinerea* de la fracción amarilla aislada de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1, son corroborados en el estudio realizado por Pezet (2000), quien demostró que el metabolito secundario 6-pentyl-alfapyrone aislado mediante HPLC, producido en muchas especies de *Trichoderma* inhibió el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*.

10.5 Pruebas en Campo

Pocos estudios han sido realizados con extractos fraccionados de hongos y aplicados a nivel de campo.

10.5.1 Incidencia de la Enfermedad Mancha Chocolate en el Cultivo de Haba

En las primeras evaluaciones los extractos obtenidos de filtrados de cultivos en batch de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1, no mostraron acción de control significativa. Esto posiblemente se deba a las condiciones favorables del clima para el patógeno, el cual le permite una elevado índice de esporulación tal como menciona Agrios (1996), señalando que los factores principales del medio ambiente que afectan el inicio y desarrollo de las enfermedades en la planta son: la temperatura, humedad y la luz. Por su parte Villarroel (1997) menciona que el patógeno *Botrytis cinerea* se desarrolla mejor en condiciones de alta humedad, en los meses de Diciembre, Enero y Febrero época de mayor precipitación en la región.

El tratamiento con la fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR), actuaron como fungicidas reduciendo la incidencia de la enfermedad mancha chocolate, estos aspectos son corroborados por Villarroel (1997), Mercado (1997) y Balchin (1997), quienes mencionan que todo extracto de origen natural y con actividad en pruebas *in vivo* son considerados como fungicidas. Estos autores trabajaron con la actividad de extractos de la muña (Villarroel *et al.*, 1997) en la reducción de la mancha chocolatada en haba, los mismos no presentaron un verdadero efecto biocontrolador de plagas fúngicas. De acuerdo a Villarroel (1997) esto se debe a que se considera a estos extractos más como insecticidas.

10.5.2 Severidad de la Enfermedad Mancha Chocolate sobre el Cultivo de Haba

Los resultados reportados coinciden con las evaluaciones de la incidencia, donde los tratamientos con menor efecto manifiestan 50 % de gravedad demostrando su poca actividad de control de la enfermedad Mancha chocolate.

10.5.3 Eficiencia de Dosis de Extractos Utilizados para el Control de la Mancha Chocolate

Si contrastamos los datos de la Figura 21 con los datos de las Figuras 22 y 23 se puede evidenciar que el comportamiento de la fracción amarilla mas la fracción roja (FA+FR) presentaron mejor eficiencia en el control de la enfermedad en relación a los otros tratamientos (75%).

10.5.4 Efecto en el Rendimiento

10.5.4.1 Número de Vainas por Planta

Como se observa en la Figura 24, la cantidad de vainas no ha reportado variantes significativas, excepto el tratamiento fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR), que reporto un promedio de 10 vainas por planta y los otros tratamientos un promedio de 9 vainas por planta, aspecto que es corroborado por similares estudio obtenidos con extracto de molle, ceniza y muña realizados por Salvatierra (1999), donde menciona que no existe variantes significativas en el numero de vainas por planta con la aplicación de productos químicos en el control del pulgón verde. Esto nos indica que los extractos no han tenido ningún efecto influyente sobre el numero de vainas, este hecho posiblemente se debe a diferentes factores como ser: variedad de haba, clima y aspectos genéticos principalmente.

10.5.4.2 Longitud de Vaina

De acuerdo a lo observado en la Figura 25, donde muestra diferentes longitudes de vaina, nos indica que los productos aplicados en el cultivo de haba, actuaron independientemente, es decir que no es lo mismo aplicar uno y otro producto y detalle

similar para las diferentes dosis de aplicación, donde también actuaron de manera independiente y finalmente, mencionar que el factor extracto influyo en la dosis utilizada o viceversa, esto porque el nivel de extracto esta directamente relacionado con la concentración de la dosis.

Las mejores longitudes se reportaron en el tratamiento con fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR), de donde se puede inferir que mostró mejor efecto en el control de la enfermedad mancha chocolate, respecto a los otros tratamientos.

10.5.4.3 Peso de 100 Semillas

Observando la Figura 26 muestra claramente podemos mencionar que existe gran diferencia entre los tratamientos aplicados frente al testigo, así por ejemplo los extractos y dosis actuaron independientemente sobre la variable peso de 100 semillas, es decir que no es lo mismo aplicar indistintamente cualquier producto y dosis, son totalmente diferentes como también será su eficiencia y finalmente tampoco existe influencia de producto sobre la dosis o viceversa.

10.5.5 Rendimiento en Vaina

La Figura 27, muestra que existe una gran independencia entre ellos, vale decir que no es lo mismo aplicar cualquier producto. Por otro lado la interacción entre producto o extracto influye en la dosis o viceversa. Los mayores rendimientos se reportaron en los tratamientos con fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR) los cuales no son comparativos con otros trabajos que son realizados en grandes áreas de cultivo de haba.

10.5.6 Rendimiento en Grano Seco

Realizado el control de la enfermedad de la macha chocolate con extractos y dosis diferentes, se reporta que el tratamiento con fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR), presenta un mayor rendimiento del grano seco lo cual significa que dicho tratamiento tuvo efecto en el control de la mancha chocolate.

10.5.7 Análisis Final

Podemos indicar que el control de la incidencia, expresado en la eficacia del producto ha tenido mucha influencia o ha sido determinante en las diferentes variables estudiadas, especialmente en la variable rendimiento en vaina y consecuentemente en grano seco, puesto que como se ha podido observar en las diversas variables estudiadas se tiene un efecto significativo; es decir que el uso de extractos en muchos casos si bien ha controlado el desarrollo del fitopatógeno, no lo ha hecho en los porcentajes esperados y en otros el control ha sido bueno controlando hasta un porcentaje óptimo (75%), cuyos resultados son mas contundentes en la última variable que es el rendimiento.

10.6 Identificación Molecular de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1

Rifai (1999) y Bissett (1991), han discutido caracteres morfológicos que emplearon para caracterizar y distinguir la especie de *Trichoderma*. Ambos autores acentuaron las dificultades inherentes en definir la especie morfológica de *Trichoderma*. Samuels (1996) también proporcionó observaciones y comentarios detallados en la utilidad de caracteres morfológicos para definir especie de *Trichoderma*. Las identificaciones basadas en caracteres morfológicos siguen siendo el método primario para la identificación y verificación de la especie en *Trichoderma*. Sin embargo un paso clave y casi inevitable de los sistemas de detección e identificación de microorganismos independientes de técnicas de cultivo es la extracción del DNA. Una serie de limitantes en ambientes naturales han hecho imposible la estandarización de un método universal, por lo que actualmente se sigue trabajando y publicando sobre el desarrollo y estandarización de protocolos de extracción útiles para distintos ambientes (Vlossiouk *et al.*, 1995; Zhou *et al.* 1996; Yeates *et al.*, 1998; Frostegard *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999; Hurt *et al.*, 2001; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Schneegurt *et al.*, 2003).

Según (Grondona *et al.*, 1997), para poder confirmar la especie de cualquier microorganismo existe análisis basados a nivel fisiológico, bioquímico y molecular.

La información obtenida de la secuencia D1/D2 de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 fue incluida en GenBank estableciendo relaciones con cepas biocontroladoras de *Trichoderma* (Hermosa *et al.*, 2000). Las secuencias de comparación de dominios

divergentes; D1/D2, en el 28 rDNA, mostró 99% de identidad con *Trichoderma inhamatum*, las misma que fueron confirmadas con el estudio morfológico a nivel micro y macroscópico.

Según Bisset (2003), la posición filogenética establecida a partir de análisis de secuencia de nucleótidos, establece comparaciones con las distintas secciones de una especie. El árbol filogenético mostró que la cepa Bol. 12 QD-1 se origina de un ancestro común al igual *Hypomyces chlorinigenus*, sin embargo no presentan las mismas características morfológicas. Basado sobre las diferencias taxonómicas y filogenéticas, la cepa Bol 12 QD-1 es miembro del género *Trichoderma*, con el nombre de *Trichoderma inhamatum*.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

11.1 Conclusiones

- Los métodos de antagonismo probados permitieron observar que el filtrado amarillo de cultivo de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 un hongo aislado de la zona de Rurrenabaque (Amazonia Boliviana), mostró actividad biológica inhibitoria sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* (80%) y sobre *Alternaria solani* (61%) cuando se lo cultiva en condiciones no agitadas. El filtrado amarillo obtenido de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 no ocasionó daños sobre la hoja de haba.
- La elevada actividad biológica inhibitoria de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD-1 fue confirmada en las pruebas de invernadero el cual mostró actividad inhibitoria en relación a los otros tratamientos.
- Se determino mediante técnicas cromatográficas que la fracción amarilla aislada del fermento producido por la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1, esta implicado en la elevada actividad biológica inhibitoria sobre los fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani* y sobre los parásitos *T. cruzi* y las tres cepas de *Leishmania*.
- Esta fracción amarilla evidenció la presencia de 6 bandas definidas sobre la placa cromatográfica.
- La prueba de sensibilidad antifúngica de la fracción amarilla frente a los hongos *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*, permitió obtener la concentración apropiada 7,5 mg/ml, misma que sirvió de referencia para su aplicación en campo.
- El tratamiento con la fracción amarilla más fracción roja (FA+FR), tuvo mayor eficiencia en el control de la mancha chocolate con 72% de eficiencia, respecto a los otros tratamientos que reportaron índices menores al 50%.

- Las variables: longitud de vaina/planta, rendimiento en vaina, peso de 100 semillas y rendimiento en grano seco, presentan un nivel elevado con la aplicación de la fracción amarilla mas fracción roja (FA+FR).

- La cepa *Trichoderma* sp. Bol 12 QD-1 fue identificada, mediante análisis molecular como *Trichoderma inhamatum* en un 99%.

11.2 RECOMENDACIONES

El uso de controladores biológicos puede significar una disminución en la contaminación de alimentos y del uso de pesticidas, resultando así una disminución de costos en la producción agrícola, reducir la aplicación de diferentes compuestos químicos, que aumentan el costo en la producción, la contaminación de alimentos y el deterioro del medio ambiente.

Las grandes posibilidades de uso de microorganismos en el control de enfermedades vegetales, estimulan las investigaciones al respecto. Sin embargo, estimula a realizar el ensayo en condiciones de campo, orientándose de esta manera el trabajo de la siguiente manera: selección de las especies o líneas más eficientes de los organismos hiperparasitos o antagónicos; alteración del medio ambiente de manera que el hiperparásito o antagonista resulten favorecidos; aprovechamiento de las sustancias antibióticas que se producen y la aplicación precisa de los antagonistas de acuerdo con el ciclo de la enfermedad.

Entre otros se recomienda realizar estudios sobre impacto de control biológico en el medio ambiente; y un control cualitativo de productos formulados provenientes de agentes de control biológico naturales como en Israel.

Priorizar estudios a nivel de biopelículas, es decir tipo de interacción de los microorganismos con las plantas y así determinar que microorganismo son benéficos para el ecosistema del suelo. Y además porque no existen trabajos al respecto.

Elucidación estructural de los metabolitos activos responsables de la actividad inhibitoria de fitopatógenos

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADKINSON, C. 2000. *Objective uses of insecticides in agricultura*. University of California. 45 pp.
- AGOSIN E; VOLPE D; MUÑOZ R; SAN MARTIN A. 2000. *Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent Trichoderma harzianum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 225-232.
- AGRIOS, G. 1991. *Fitopatología*; 1ra edición; Edit.Limusa; Mexico.
- AGRIOS, G. 1996. *Fitopatología*; 2da edición; Edit.Limusa; Mexico.
- AGRIOS, 1998. *Fitopatología*; 3da edición; Edit.Limusa; Mexico.
- AHMAD, J y BAKER. 1987. *Competitive Saprophytic and cellulolytic activity of rhizosphere competent mutants of Trichoderma harzianum*. Phytopatology 77: 358-362.
- ALACARAZ F, VISITIN G y GARCIA B. 1999. *Selección in vitro de Bacillus spp como biocontroladores de Fusarium*. Revista Argentina de Fitopatología 34(2).
- ALIPI H y MONACO C. 1990. *Antagonismo de hongos fitopatógenos y saprobios en suelos hortícolas*. Revista Argentina de Microbiología. 22: 90-30.
- ALAVARADO J, BELTRÁN D y MONTNEGRO M. 2000. *Caracterización de proteínas antifungicas de semillas de Lobularia maritima y su aplicación en biotecnología*. Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición UNMSM.
- ASTORGA P. 2005. *Estudio de posibles biocontroladores de fitopatógenos de haba (Vicia faba) y de papa (Solanum tuberosum)*. Tesis de Licenciatura UMSA.
- ASSANTE G, CAMARDA L , LOCCI R, MERLINI L , NASINI G y PAPPADOPULUS E. 1981. *Isolation and structure of red pigments from Aspergillus flavus and related species, grown on a differential medium*. J.Agric. Food Chem. 765-766.

- BAKER R, ELAD Y y CHET Y. 2000. *The controlled experiment in the scientific method whit special emphasis on biological control*. Phytopatology 74:1019-1021.

- BAJSA N, ARIAS B y THOASHOW B. 1999. *Cepa de Pseudomonas fluorescens productora de multiples antibioticos*. Uruguay. Revista de Fitopatología 34(2):53

- BALCHIN I. 1997. *Bioactyvity of new Zeland medician Plant Essential Oil*. Journal of applied microbiology london, pp. 22-23.

- BARNETT H y HUNTER B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungus*. Burgess Publisching Company Minnesota, U.S.A 241pp.

- BELL D, WARKHAM A. 1982. *In vitro antagonism of Trichoderma species against six fungal plant patogens*. Phytopatology 72:379-382.

- BETTIOL W. 1996. *Biological Control of plant pathogens in Brazil: aplication and current research*. World Journal of Microbiology y Biotecnology Vol 12:505-510.

- BLANCO G. 1985. *El impacto de los antibióticos*. Edit. Universal Salamanca 9-12

- BOTHAST F, LUMSDEN R y CONNICK J. 1985. *Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix*. Phytopathology 75, 774±7.

- BRIZUELA A, GARCIA L, PEREZ L y MANSUR M. 1998. *Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios*. Rev Iberoam Micol 15:69-74.

- CAHUAN Y, ZIMMAND G, ZAQS Y, ZURIEL S y CHET I. 1993. *Use of Trichoderma harzianum in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (Botrytis cinerea) under commercial greenhouse conditions*. Plant Pathol. 42, 324±32.

- CHET I. 1990. *Biological control of soilborne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments*. 72: 112-116.

- CHET I y BAKER R.1980. *Induction of supressivenes to Rhizoctonia solani in soil*. Phytopatology 70:994-998.

- CHILON B. 1991. *Interactions between pesticides and soil micro - organisms*. Annual Review of Microbiology 15 :69 –92.
- Comunicación Personal, Giménez . 2005.
- COOPER citado por AKEM C y DASHIELL L. 1991.
- CSIKTUNÁDI K, FORGACS E, CSERHATI T, VIZCAINO J. 2000. *Colour pigments of Trichoderma harzianum. Preliminary investigations with thin-layer chromatography-fourier transform infrared spectroscopy and high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 896 61 – 68.
- DEMAIN L. y SOLOMON A. 1999. *Manual of the Industrial Microbiology and Biotechnology*. American society for Microbiology Washington.
- DURMAN S, MENENDEZ A y GODEAS A. 1999. *Evaluación de Trichoderma spp como antagonistas de Rizhocotonia solana in vitro y como biocontrolador en plantas de tomate*. Revista Argentina de Micología 31:13-18.
- EGUISQUIZA C, CASTLEBURY L, SAMUELS G y GEISER D. 2003. *Multilocus phylogenetic structure within the Trichoderma harzianum /Hypocrea lixii complex*.Molecular Phylogenetic and Evolution 27 :302 –313.
- ELAD Y y KATAN J. 1980. *Trichoderma harzianum: A biocontrol effective against Sclerotium roldsii and Rhizoctonia solani*. Phytopatology 70:418-422.
- ELAD Y, CHET I y HENIS, Y. (1982) *Degradation of plant pathogenic fungi by Trichoderma harzianum*. Can J. Microbiol. 28, 719±25.
- ESCANDE A , PEDRAZA Y AGUERO. 1999. *Evaluación de Gliocadium spp y Trichoderma spp para el biocontrol de la pudrición húmeda del capitulo del girasol (S.Sclerotium)*. Revista Argentina de Fitopatologia 34 (2):53.
- Estación Metereologica de Tiwanaku, 2001.

- FAO. 1990. *Plagas de las hortalizas*. Manual de manejo integrado Sgto. de Chile. 550 pp.
- FAO. 1999. *Manual para Patólogos Vegetales*. Recibido por COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE. Pacific Press, Lima –Peru, pp. 30 – 150.
- Farmacopea Americana USP XXII.
- FLENTJE G y ROWLAND G. 1993. *Antifungal metabolites from Trichoderma harzianum* .Journal of Natural Products 56 : 1799 –1804.
- FEDEPAPA, 1990.
- FRAVEL, D. 1988. *Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease*. Rev.Phytopatology 26:75-91.
- FRENCH, E y TEDDY H. 1988. *Métodos de Investigación Fitopatológica*; Edit IICA Costa Rica.
- Fundación Proinpa et al, 2002
- GREEN H, LARSEN G, OLSON K, JENSEN T Y JAKOBSEN A. 1999. *Supresión de l agente biocontrolador Trichoderma harzianum por micelios de hongos micorrizales arbusculares Glomus untraradices en raiz libre del suelo Applied and Enviromental Microbiology 65(4):1428-1434.*
- GRONDONA I, HERMOSA R, TEJADA M, GOMIS M, MATEOS P, BRIDGE P,MONTE E, GARCYA- A. 1997. *Physiological and biochemical characterization of Trichoderma harzianum and biological control agent against soilborne fungal plant pathogens*.Applied and Environmental Microbiology 63 :3189 –3198.
- HADAR Y, CHET I y HENIS Y. 1979. *Biological control of Rhizoctonia solani damping-off with wheat bran culture of Trichoderma harzianum* . Phytopatology 69:64-68.
- HENDERSON K y NITTLON L. 2000.*Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of Trichoderma harzianum from alginate supresion of Rhizoctonia spp. damping-off in bark compost media*. Phytopathology 77:1206-1212. 1987.

- HERMOSA R, KECK E, CHAMORRO I, RUBIO B, SANZ L, VIZCAINO J, GRONDONA I y MONTE E. 2004. *Genetic diversity shown in Trichoderma biocontrol isolates* Mycol.Res.108 (8):897 –906.

- HIGGS R, ZAHN J, GIGY J y MILTON M. 2001. *Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts*. Applied and Environmental Microbiology 67(1) 371-376.

- HOESTRIA Y SAMSON 1981, SAMSON 1989, PITT 1988, GAMS y DOMSCH 1980, BARNETT 1998. *Taxonomy of fungi*.

- HUAMÁN B, SIMON A, WELLER D. 1996. *Combination of Trichoderma koningii with Pseudomonads fluorescent for control of Take-all on wheat*. Phytopathology 86, 188±94.

- INE. 1999. Datos estadísticos de la producción de plantas de importancia en Bolivia.

- INSITUTO GEOGRAFICO MILITAR Y SERVICIO GEODESICO INTERAMERICANO. 1991. Carta Nacional, Esc. 1:50.000, hoja 584511, Serie No. 735844 IV, H 731. La Paz – Bolivia.

- KNADSEN G. 1990. *Effects of soilmoisture, and wheat bran on growth of Trichoderma harzianum from alginate pellets*. Phytopatology 80:724-727.

- KRUPA y DONMARGUES. 1981. *Ecology of root pathogens*; 2da edición; Elsevier scientific publishing company. U.S.A.

- LEWIS, J y PAPAIVIZAS G. 1985. *Characteristics of alginate pellets formulated with Trichoderma and Gliocadium and their affects on proliferation of the fungus in soil plant*. Pathology 34: 571-577.

- LEWIS, J AND PAPAIVIZAS G. 1987. *Aplication of Trichoderma and Gliocadium in alginate pellets for control of Rizoctonia damping – off plant*. Pathology 36:438-446.

- Manual para el uso de plaguicidas, 1998.

- Manual fitosanitario de manejo de plagas, 1998.

- Ma de Lourdes, 1991. *Fitopatología*. Edit. Limusa; Mexico.

- MERCADO M. 1997. *Investigación e identificación de especies vegetales con actividad antifúngica*. Tesis Lic. En Bioquímica y Farmacia, UMSA, pp. 32-54.

- MONT K, HADAR Y, CHET I, HENIS Y. 1993. *Biological control of Rhizoctonia solani damping-off with bread culture of Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69:64-68. 1979.

- MITIDIERI I. 1998. *Control biológico de Hongos de suelos con Trichoderma* IDIA 44:45-49.

- MUÑOZ M, JULIAN E, GARCÍA-BARCELÓ M, AUSINA M, LUQUIN J. 1997. *Chromatogr. B.* 689:341.

- NOMURA H, OHARA Y y OKAMURA K. 1979. *Journal of fermentation technology. A microorganism producing a new B-lactam antibiotic.* 57(4):265-267.

- OBERTI H, CHET I, BAKER R. 1999. *Trichoderma hamatum effects on seed and seedlings diseases induced in radish and pea by Pythium spp. or Alternaria solani*. Phytopathology 70:1167- 1172. 1980.

- OLIVOS, F. 1989. *Antagonismo microbiano para Sclerotium rolfsii causante de la pudrición basal de Hordeum vulgare*. U. agraria.

- PELAEZ P. 2002. Tesis “*Evaluación de la capacidad biocontroladora de hongos frente a fitopatógenos que afectan cultivos de papa (solanum tuberosum) y haba (vicia faba) en el altiplano boliviano*” UMSA.

- PEZET R, PONT V y TABACCHI R. 2000. *Simple Analysis of 6 – pentyl –alfa- Pyrone, a Major Antifungal Metabolite of Trichoderma spp., Useful for Testing the Antagonistic activity of these fungi*. Phytochemical Analysis. 285-288.

- PROINPA, PROBIOMA, Probiotec. 2004.

- Programa de Leguminosas de Grano del IBTA. 2002

- RAMÍREZ J. 1986. Serie Agropecuaria (cartilla) Fondo Social de Emergencia, La Paz – Bolivia, p. 1.

- RIFAI (1999) Y BISSETT (1991) (VLOSSIOUK ET AL ., 1995; ZHOU ET AL., 1996; YEATES ET AL ., 1998; FROSTEGARD ET AL., 1999; MILLER ET AL., 1999; HURT ET AL., 2001; MARTIN-LAURENT ET AL.,2001; SCHNEEGURT ET AL., 2003).

- RIVERA R. 1995. *Trichoderma viridae* y fungicidas sistemicos en el control de *sclerotium rolfsii* en mani bajo condiciones de invernadero.

- RODRÍGUEZ P. 2002. Tesis de Maestria. “Efecto antagonico de microorganismos contra *Rizocotnia solana* en plantas de tomate”. Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Bioquímica y Farmacia.

- ROSSET M y ALTIERI M. 1999. Antagonismo “in vitro” de *Trichoderma spp.* a *Verticillium dahliae* KLEB. Scientia Agrícola 55: 1-7. 1998.

- SALCEDO D. 1993. *La Microbiologia clinica y el laboratorio bioquímico*. Graf Impresiones Lima-Peru.

- SALVATIERRA, F. 1999. *Fluctuación poblaciones del pulgon y diagnostico de plagas secundarias de haba en higachi*. Tesis de Ing. Agronomica. UMSA. La Paz – Bolivia. Pp. 167.

- SARMIENTO E y SANFUENTESA. 1999. *Caracterização de isolados, flutuação populacional e controle biológico de Rhizoctonia spp. em jardimclonal de Eucalyptus*. (Tese de Doutorado). Viçosa, MG, UFV, Imprensa Universitária.

- SIMON A. 1987. *Metodos de investigación fitopatológica*. San Jose-Costa Rica. Pp144-200.

- SOLIZ N. 2004. Tesis de Maestria “Evaluación de la actividad biologica inhibitoria de hongos de tierra sobre *Rhizocotonia solani* in vitro y en parcelas de cultivo de papa”. Univerisdad Mayor de San Andres. Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquimicas. Instituto de Invesitgaciones Farmaco Bioquimicas.

- SUTTON G, GOLDMAN G, JACOBS D, ARDILES W y VILA S. 1996. *Molecular genetic studies of mycoparasitism by Trichoderma spp.* Ph.D. Thesis, Gent University Gent, Belgium.

- COLABORADORES, 1997. *Manual de micología experimental*. UBA. Buenos Aires.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

- TORRENEGRA R, BAQUERO J. 2000. *Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de Penicillium spg 28 aislada del paramo de guasca departamento de cundinamarca*. Pontificia Universida Javeriana.

- VILLARROEL D. 1997. *Manejo de Plagas*. 1ed. Cadia Ballance. Cochabamba – Bolivia. Pp. 3 -135.

- VILLARROEL D. 2000. *Manejo ecologico de plagas prevencion y control*. Tesis de Maestria Facultad de Ciencias Agrícolas y Pecuarias Dr. Martin Cardenas, Universidad mayor de san Simón. Cochabamba – Bolivia, pp 3-40.

- WOOLFE, 1987, VAN MONTAGU, M y HERRERA-ESTRELLA A. (1993). *Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, prb 1, related to mycoparasitism by Trichoderma harzianum*. Mol. Microbiol. 8, 603±13.

- WRIGHT E, ZAPATA E, RIVERA G, PALMUCI A. 1999. *Uso de agentes biológicos y de enmiendas orgánicas para el control de fitopatógenos del suelos en cultivo hortícolas* Rev. Argentina de Fitopatología 34(2):61.

- ZABALA (1988) SILVEIRA, S.F. *Etiologia e controle da mela de estacas e da quei made folhas de eucalipto, causada por Rhizoctonia spp.* (Tese de Doutorado). Viçosa, MG, UFV, Imprensa Universitária, 1996.

- ZCHULTZ, 2000 ELAD, Y y CHET I. (1995) *Practical approaches for biocontrol agents implementation. In R. Reuveni (ed) Novel approaches tointegrated pest management*, pp. 323±38. Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers Inc.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Equipos utilizados

Anexo 2. Reactivos utilizados

Anexo 3. Medios de cultivo

Anexo 4. Tratamientos en invernadero

Anexo 5. Curva de calibración de la fracción amarilla (H₂O/MeOH: 60/40) obtenida en cultivos de *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1

Anexo 6. Relación entre la absorvancia, concentración y el porcentaje de inhibición

Anexo 7. Tecnica de extracción, purificación y secuenciación de DNA

Anexo 8. Analisis de varianza de un solo factor

Anexo 9. Evaluación final de la parcela experimental. Incidencia de la enfermedad mancha chocolate en el cultivo de haba

Anexo 1. Equipos utilizados

El material, reactivos y medios de cultivo, fueron esterilizados en Autoclave Electrici Pressure Steam Sterilizer Model No. 25X por 15 minutos a 1.5 atmósferas de presión y 121 °C.

El análisis espectrofotométrico fue realizado en un equipo espectrofotometrico Cintra 5 UV visible de doble haz (GBC Scientific Equipment, USA).

La identificación microscópica de los hongos biocontroladores y fitopatógenos se llevo a cabo con microscopio electrónico

La colecta del micelio durante la extracción de DNA se realizo sobre un papel de filtro en un embudo buchner

El conteo de esporas se llevo a cabo en cámara de Neu Bauer

La centrifugación de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos tanto en batch agitado y estacionario fueron realizados en centrifugadora Fischer Cientific

La medición de los pH de los cultivos en Batch Agitado y Estacionaro en un phmetro Orion (model 420 A)

El fraccionamiento del fermento producido por el hongo QD12-1 se llevo a cabo con un equipo de cromatografía en una columna fase reversa (Artesanal) empacada con CCRP18.

Para la cuantificación de base de nucleotidos se utilizo el programa de computadora (DC290 camera)

La secuenciación de nucleotidos se realizo por BM labbet company-Sweden y el analisis de los cromatogramas programa: ChromasLite Version 2.0; 1998-2004 y la comparación de nucleótidos: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> así mismo la comparación de nucleótidos entre especies cercanas, por el programa DNA man.

Anexo 2. Reactivos utilizados

Buffer Tanquay

Reactivo	Concentración	Marca o Importadora
KH ₂ PO ₄	0,075g/85ml	Merk Alemania
Na ₂ HPO ₄	0,10g/85ml	Biopack
Glicerol	15ml/85ml	

Buffer buffer Tris-EDTA

Reactivo	Concentración	Marca o Importadora
Tris HCl pH8	100 mM	Merk Alemania
SDS	1%	Biopack
EDTA	10mM	
NaCl	100mM	

Tinciones

Azul de Lactofenol

Reactivo	Concentración	Marca o Importadora
Fenol, cristales	20g/20ml	Merk Alemania
Acido Láctico	20g/20ml	Biopack
Glicerina	40g/20ml	

Enzimas

Enzima	Marca o Importadora
RNAasa (10mg/ml)	Biopack
Enzima Taq Pol 0.2ul	

Solventes. Destilados en el IIFB

Reactivo	Marca o Importadora
Metanol	Biopack
Agua	Biopack

Otros reactivos

Reactivo	Marca o Importadora
Acetato de etilo	Biopack
Acetona	Biopack
Solución de HCl	Biopack
Agua miliQ	Biopack
Fenol:cloroformo:alcohol isoamil (25:24:1)	Biopack
Isopropanol 85%	Biopack
Etanol 70%	Biopack
agarosa al 0.8%	Biopack
bromuro de etidio.	Biopack
azul de bromotimol	Biopack
Buffer STR	Biopack
Buffer (Pink)	Biopack
Primer F63	
Primer LR3	

Anexo 3. Medios de cultivo

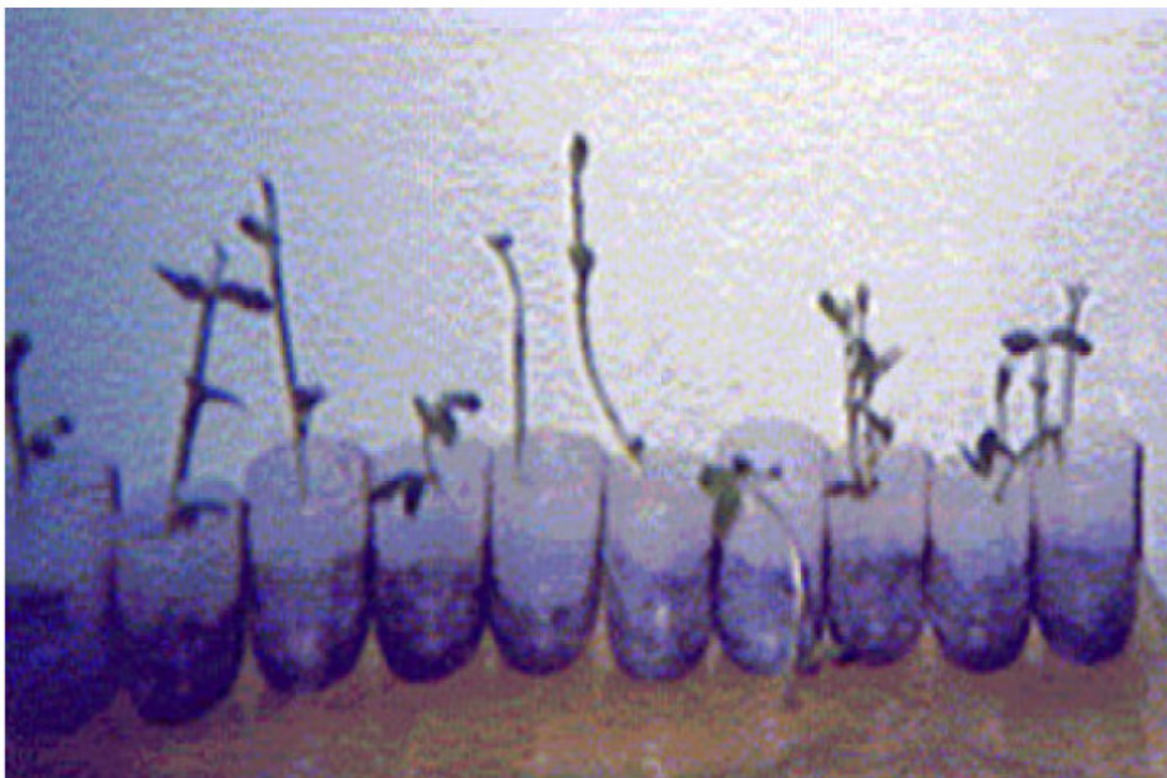
Agar Papa Dextrosa

Reactivo	Concentración	Marca o Importadora
Glucosa	10g/L	Baker Analyzed Regent
Agar-Agar	15g/L	Oxoid
Trozos de papa pelada	250g/L	-----

Caldo Papa Dextrosa

Reactivo	Concentración	Marca o Importadora
Glucosa	10g/L	Baker Analyzed Regent
Trozos de papa pelada	250g/L	-----

Anexo 4. Tratamientos en invernadero



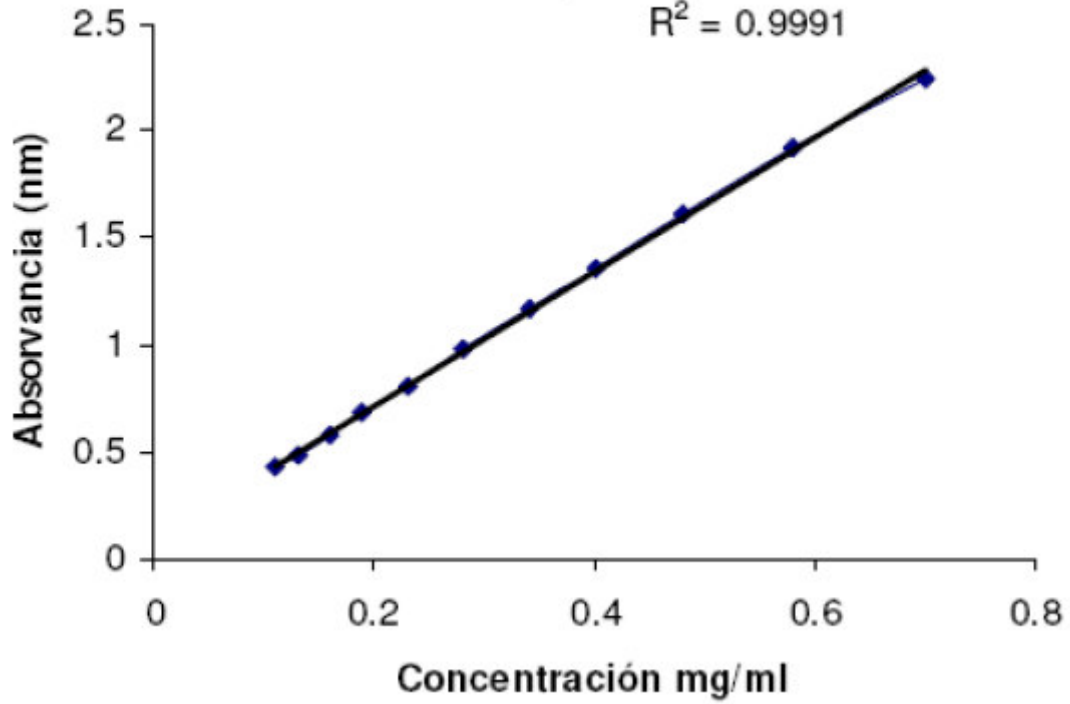
Anexo 5. Curva de calibración de la fracción amarilla (H₂O/MeOH:60/40) obten en cultivos de *Trichoderma spp* Bol 12 QD-1

Concentración pigmento amarillo (mg/ml)	Absorbancia (nm)
0.70	2.24
0.58	1.92
0.48	1.61
0.40	1.36
0.34	1.17
0.28	0.98
0.23	0.80
0.19	0.68
0.16	0.58
0.13	0.49
0.11	0.43

Curva de calibración a 370 nm

$$y = 3.1238x + 0.0922$$

$$R^2 = 0.9991$$



Anexo 6. Relación entre la absorvancia, concentración y el porcentaje de inhibición

Dias	Absorbancia (370 nm)	Concentración de pigmento amarillo mg/ml	% Inhibición de <i>Alternaria solani</i>	% Inhibición de <i>Botrytis cinerea</i>
1	0.1087	0.556	1.5	2
2	0.1380	0.100	1.5	2
3	0.1746	0.113	2	2
4	0.5206	0.142	2	4.5
5	0.6874	0.18	4	5
6	0.6931	0.182	4	6
7	0.8674	0.34	13	11
8	1.2626	0.376	16	16
9	1.2846	0.378	22	23
10	1.3412	0.38	33	27
11	1.3702	0.44	42	35
12	1.3905	0.442	51	49
13	1.3982	0.442	53	56
14	1.4824	0.44	57	56
15	1.4880	0.44	57	58
16	1.5121	0.452	57	60
17	1.5175	0.452	57	60
18	1.5325	0.453	57.5	60
19	1.5530	0.456	57.5	60
20	1.5604	0.468	58	63
21	1.5685	0.468	58	63
22	1.5734	0.471	58	63
23	1.5790	0.471	58	65
24	1.5795	0.471	58	65.6
25	1.5801	0.471	58.5	67
26	1.5860	0.471	58.5	67
27	1.5895	0.471	59	67
28	1.6105	0.481	59	67
29	1.6150	0.481	59	67
30	1.6190	0.481	59	67
31	1.6195	0.481	59	67
32	1.7023	0.50	59	69
33	1.7025	0.50	60	69
34	1.7085	0.50	60	69.5
35	1.7201	0.516	60	70.5
36	1.7275	0.516	60	71
37	1.7280	0.516	60	72
38	1.7560	0.523	60.5	72
39	1.7565	0.523	60.5	72
40	1.7580	0.523	61	72

41	1.8001	0.54	61	72
42	1.8565	0.554	61	73
43	1.8590	0.554	61	74
44	1.8601	0.560	61	74
45	1.8656	0.560	61	74
46	1.8724	0.564	61	74
47	1.8780	0.564	61	74
48	1.8906	0.569	61	76
49	1.8909	0.569	61	76.5
50	1.9021	0.57	61	78
51	1.9025	0.57	61	79
52	1.9130	0.578	61	79
53	1.9150	0.578	61	79
54	1.9120	0.58	61	79
55	1.9205	0.58	61	79
56	2.2401	0.70	61	79.9

Anexo 7. Técnica de extracción, purificación y secuenciación de DN

Extracción de DNA

- 1) Colocar 0.3 g de perlas de vidrio de 0.5 mm por cada eppendorf de 1.5 ml (3 g. de perlas para 8 eppendorf deben ser lavadas por dos horas mediante agitación magnética en una solución de HCl:H₂O 1:2)
- 2) Autoclavar los eppendorffs y secarlos en estufa sin destapar
- 3) Colocar aprox 1.5 ml de micelio en otro eppendorf.
- 4) Centrifugar 5 min a 13,000 rpm, lavando dos veces el micelio con agua miliQ
- 5) Resuspender el pellet con 200 µl de buffer TRIS – EDTA (TRIS HCl pH 8 100 mM; SDS 1%; Triton 100 2%; EDTA 10 mM; ClNa 100 mM)
- 6) Trasladar todo el contenido micelial a un tubo con perlas y agregar 200 µl de Fenol:Cloroformo:Isoamil alcohol (25:24:1).
- 7) Vortexear 3 minutos.
- 8) Colocar los eppendorfs en el freezer a – 20 °C por 3 minutos.
- 9) Repetir los pasos 7 y 8 un total de cinco veces.
- 10) Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 11) Centrifugar a 10000 rpm por 5 min.
- 12) Transferir la fase superior a un nuevo eppendorf (esteril)
- 13) Añadir 1 volumen de cloroformo:isoamilico (24:1), vortexear 30 seg y centrifugar a 13,000 rpm por 5 min
- 14) Transferir la fase superior a un nuevo eppendorf.
- 15) Precipitar el DNA con 1 volumen de isopropanol
- 16) Centrifugar a 13,000 rpm por 20 min.
- 17) Lavar el DNA con etanol al 70% 500 µl
- 18) Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min
- 19) Lavar el DNA con etanol al 70% 500 µl
- 20) Centrifugar a 13000 g por 5 min
- 21) Remover el sobrenadante cuidadosamente, recordar que el pellet se encuentra en el costado donde se encuentra la oreja de la tapa del eppendorf.
- 22) Secar el DNA en el flujo laminar por 1 o 2 horas
- 23) Resuspender con 150 µl de agua miliQ + 1µl de RNAsa (10 mg/ml) y dejar a 37° C toda la noche.

PCR – Amplificación

- 1) Diluir los primer 1:2 10 µl de Primers (stock) con 10 µl de H₂O milliQ.
- 2) Protocolo: pRIMERS F63 / LR3 (fragmento D1D2)

H ₂ O	44 µl
Buffer STR	5 µl
Primer f	0.3 µl
Primer r	0.3 µl
Enzima Taq pol	0.2 µl
DNA	0.2 µl
Total	50.0 µl

Cond PCR para F63 / LR3

94 °C x 3' [94 °C x 1', 55 °C x 1', 72 °C x 1']₃₀ 72 °C x 7', 4 °C x α

F63: 5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3'

LR3 5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'

Purificación de DNA

- 1) Preparar Gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio. Correr las bandas a 40 V por 3 hrs, con marcador de peso molecular 1 kb.
- 2) Cortar el gel que contiene el DNA a la altura de <750 pb para la region D1/D2 flanqueada por F63 / LR3 y el DNA > 800 pb para la region ITS flanqueada por ITS 1f/ITS 4B
- 3) Protocolo de Purificación de bandas de DNA (ver Quiagen KIT)

Secuenciación de DNA

- 1) Protocolo

H ₂ O	13.7 µl
Buffer (Pink)	4 µl

Buffer (White)	2 μ l
Primer	0.1 μ l
DNA	0.2 μ l

Total 20.0 μ l

Programa SEQ 1 en Osvaldo (User)

- 2) Agregar 80 μ l de Isopropanol al 75% y dejar reposando a 4 °C toda la noche
- 3) Centrifugar a 14,000 rpm 5 min
- 4) Sacar el sobrenadante con pipeta
- 5) Agregar Isopropanol al 75% 100 μ l, centrifugar 5 min a 14,000 rpm
- 6) Sacar el sobrenadante con pipeta
- 7) Agregar Isopropanol al 75% 100 μ l, centrifugar 3 min a 14,000 rpm
- 8) Sacar el sobrenadante con pipeta con CUIDADO
- 9) Dejar secar en el Desecador por lo menos 3 horas.

Anexo 8. Analisis de Varianza de un solo factor

Hipótesis:

Ho: No existen diferencias entre los tratamientos

H1: Existen diferencias entre los tratamientos

Utilizando un nivel de significancia: 0,05

Analisis de varianza de un factor para el tratamiento de *Botrytis cinerea*

Fuente de variacion	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	Fo	P.Tabulado
Entre tratamientos	20.371	6	3.395	3.552	0.009
Total	20.371	6			

Existen diferencias significativas en el grado de antagonismo sobre *Botrytis cinerea* para cada tratamiento

Analisis de varianza de un factor para el tratamiento de *Alternaria solani*

Fuente de variacion	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados medios	Fo	P.Tabulado
Entre tratamientos	18.371	6	3.0618	3.017	0.006
Total	18.371	6			

Existen diferencias significativas en el grado de antagonismo sobre *Alternaria solana* para cada tratamiento

Anexo 9. Evaluación final de la parcela experimental. Incidencia de la enfermedad mancha chocolate en el cultivo de haba

