

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

UNIDAD DE POSTGRADO



TESIS DE MAESTRÍA

EFFECTO DE TRES DOSIS DE EXTRACTO DE SAPONINA DE QUINUA (*Chenopodium quinoa* WILLD.) EN SU FORMA SOBRENADANTE PARA EL CONTROL DEL HONGO *BOTRYTIS* SP. BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO Y EN CULTIVO DE HABA

Postulante:

Ing. Agr. Gloria Leticia Flores Torrez

Asesor(es):

Ing. Agr. M. Sc. Harold Barrientos Llanos

La Paz – Bolivia

2017

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

FACULTAD DE AGRONOMÍA

UNIDAD DE POSTGRADO

*Tesis de Maestría presentado como requisito parcial para optar
al Título de Maestro en PRODUCCIÓN VEGETAL*

**EFFECTO DE TRES DOSIS DE EXTRACTO DE SAPONINA DE QUINUA
(*Chenopodium quinoa* WILLD.) EN SU FORMA SOBRENADANTE PARA EL
CONTROL DEL HONGO *BOTRYTIS* SP. BAJO CONDICIONES DE
LABORATORIO Y EN CULTIVO DE HABA**

Postulante:

Ing. Agr. Gloria Leticia Flores Torrez

Asesor(es):

Ing. Agr. M. Sc. Harold Barrientos Llanos

La Paz – Bolivia

2017

Dedicatoria:

A Darlin Vega y a mí amada hija Katy

Quienes son la fortaleza en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Mediante el presente trabajo de investigación, deseo agradecer a aquellos que de alguna manera contribuyeron en la realización del presente trabajo:

A la Facultad de Agronomía UMSA, a los docentes y administrativos de Postgrado, por la colaboración y conocimientos impartidos para mi formación.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas UMSA por proporcionar el material vegetal saponina para la aplicación y uso en este trabajo.

Al Ing. M.Sc. Harold Barrientos Llanos por colaborar como asesor, la ayuda, paciencia y amistad en todo este tiempo

A mis grandes amigos de la Maestría en Producción Vegetal primera versión, por sus consejos y alentarme para seguir adelante.

Especialmente agradecer a mi **Querido Papá** por su amor y entrega, es la principal persona para la consolidación de mis metas, a Amparo Salazar por tanta ayuda y apoyo, a Mirna Roman por toda su ayuda. Y sobre todo a mi **Darlin Vega** por estar a mi lado en todo momento, y ser mi mejor apoyo junto a mi **Amada Hija Kathy**, quien es la mayor Bendición que Dios me dio, por ser mi inspiración y fuerza en cada momento de mi vida.

Por último quiero agradecer a **Dios**, por ser el Maestro y Creador de mi vida, pues sin su infinito amor no tendría junto a mí a todos aquellos seres queridos que siempre estarán a mi lado para seguirme apoyando incondicionalmente.

RESUMEN

La producción de haba en el altiplano se ve limitado por diferentes aspectos ya sean climáticos o que están directamente relacionados con el propio cultivo el cual puede sufrir ataque de plagas o aspecto patológico así que el presente estudio se orienta a poder aportar a la reducción de patologías de origen fúngico para esto se realizó el presente estudio en predios del Municipio de Chicani Provincia Murillo del departamento de La Paz, con el objetivo de evaluar el control de *Botrytis* con tres dosis de saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en su forma sobrenadante en laboratorio y en cultivo de haba.

La investigación se realizó tres fases. En la primera fase en la zona de investigación, se identificó la enfermedad Mancha de Chocolate bajo los síntomas característicos que se presentan en el cultivo de haba; para recolectar muestras de partes de órganos dañados para su posterior aislamiento en laboratorio, en la fase dos en laboratorio se aisló el patógeno para ser identificado macroscópica y microscópicamente como *Botrytis fabae* y se realizó el control con la aplicación del extracto de saponina sobrenadante en tres diferentes dosis, y la tercera fase en el cultivo de haba se realizó de acuerdo al diseño experimental, la aplicación de extracto de saponina sobrenadante en tres dosis (1/100, 1/1000 y 1/10000) y tres aplicaciones durante el ciclo del cultivo con la finalidad de medir el comportamiento de este sobre el patógeno *Botrytis fabae*, midiendo variables así como también el rendimiento en el cultivo de haba.

Concluyendo que la saponina sobrenadante en la dosis 1/100 fue la que mejores resultados presento en laboratorio y en casi todas las variables propuestas.

ABSTRACT

Bean production in the highlands is limited by different aspects, whether they are climatic or directly related to the crop itself, which can suffer a pest attack or pathological aspect, so the present study is aimed at contributing to the reduction of pathologies Of fungal origin for this, the present study was carried out on the premises in the Municipality of Chicani Murillo Province of the department of La Paz, with the objective of evaluating the control of *Botrytis* with three doses of saponin of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) In its supernatant form in laboratory and in bean culture.

The research was conducted in three phases. In the first phase in the research area, Chocolate Spot disease was identified under the characteristic symptoms that occur in bean culture; To collect samples of parts of damaged organs for later isolation in the laboratory, in phase two in the laboratory the pathogen was isolated to be identified macroscopically and microscopically as *Botrytis fabae* and control was performed with the application of the saponin extract supernatant in three different And the third phase in bean culture was performed according to the experimental design, application of supernatant saponin extract in three doses (1/100, 1/1000 and 1/10000) and three applications during the culture cycle With the purpose of measuring the behavior of this on the pathogen *Botrytis fabae*, measuring variables as well as yield in bean culture.

Concluding that the supernatant saponin in the dose 1/100 was the one that presented better results in the laboratory and in almost all the proposed variables.

Índice General

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	2
1.2 Justificación	3
1.3 Objetivos.....	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd) como materia prima para la laboración de un fungicida natural.....	5
2.1.1 Origen	5
2.1.2 Taxonomía.....	5
2.1.3 Descripción botánica de la quinua.....	6
2.1.4 Saponinas.....	7
2.1.5 Beneficios de la saponina	8
2.1.6 Saponina en su forma sobrenadante	9
2.1.7 Determinación de saponina	11
2.1.7.1 Prueba de espuma	11
2.1.8 Reutilización de la saponina	12
2.1.9 Extractos de plantas como agentes de control	14
2.2 Cultivo de haba.....	15
2.2.1 .Origen de la especie.....	15
2.2.2 Clasificación taxonómica	15

2.2.3 Cultivo del haba en Bolivia	15
2.2.4 Morfología.....	16
2.2.5 Importancia económica.....	16
2.3 Los hongos.....	17
2.3.1 2.4.6 Crecimiento de hongos	17
2.3.2 <i>Botrytis fabae</i> mancha de chocolate	18
2.4 Factores que influyen en la aparición de botrytis	20
2.5 Ciclo de la enfermedad.....	20
2.6 Control del ataque de <i>Botrytis</i>	22
2.6.1 Termoterapia.....	22
2.6.2 Uso de Fungicidas	22
2.6.3 Control biológico de enfermedades.....	23
2.6.4 Control con métodos naturales	24
2.7 Extractos vegetales	24
2.7.1 Ventajas y desventajas de los extractos vegetales	25
a) Principales ventajas	25
b) Principales desventajas.....	25
2.7.2 Plantas que se pueden utilizar para la elaboración de extractos naturales.....	26
2.7.3 Aplicación con Productos Fitosanitarios	26
2.8 Medios de cultivo	27
2.8.1 Aislamiento a partir de hojas.	27
2.9 Aislamiento a partir de tallos, frutos y otros organos areos de la planta.....	30
2.9.1 Aislamiento a partir de raices, tuberculos, raices carnosas y frutos de hortalizas que se encuentran en contacto con el suelo, etc.....	30
2.9.2 Métodos de aislamiento	30

3 MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 Localización.....	33
3.2 Materiales	34
3.2.1 Materiales de laboratorio.....	34
3.2.2 Material Vegetal	34
3.2.3 Material de gabinete	34
3.3 Metodología.....	35
3.3.1 Fase 1, Recolección e identificación del hongo en campo	35
3.3.2 Fase 2. Aislamiento del hongo y tratamiento con saponina	35
a) Aislamiento del hongo.....	35
b) Tratamiento de <i>Botrytis</i> con saponina.....	38
3.3.3 Fase 3. Aplicación del tratamiento en el cultivo de haba (<i>Vicia faba</i> L.) en campo	39
3.4 Diseño experimental.	41
3.4.1 Características de la unidad experimental	41
3.4.2 Modelo lineal.....	41
3.5 Variables de respuesta	42
3.6 Parametros de evaluación.	43
3.6.1 Identificación del agente causal de la mancha de chocolate.....	43
3.6.2 Incidencia de <i>Botrytis</i>	43
3.6.3 Evaluación de las tres dosis y su efecto en el cultivo.....	43
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	44
4.1 Resultados primera fase recolección e identificación del hongo en campo.....	44
4.2 Resultados segunda fase laboratorio.....	45
4.2.1 Identificación de hongos fitopatogenos.....	46

a) Examen macroscópico de la <i>Botrytis</i> sp.....	45
b) Examen microscópico de la <i>Botrytis</i> sp.....	45
4.2.3 Porcentaje de inhibición de <i>Botrytis</i> sp.....	46
4.2.4 Crecimiento del hongo en cm.....	48
4.3 Resultados tercera fase aplicación de tratamientos en cultivo en campo.....	51
4.3.1 Evaluación de parcelas.....	51
4.3.2 Temperaturas registradas.....	52
4.3.3 Humedad Relativa.....	53
4.3.4 Incidencia de <i>Botrytis</i> en campo.....	53
4.3.5 Altura de la planta cm.....	57
4.3.6 Área foliar cm ²	59
4.3.7 Materia verde Kg/m ²	62
4.3.8 Largo de vaina cm.....	64
4.3.9 Peso de vaina Kg.....	67
5. CONCLUSIONES	69
6. RECOMENCIONES	70
7. BIBLIOGRAFÍA	71
8. ANEXOS	75

Índice de cuadros

Cuadro 1. Posición taxonómica de la quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd).....	6
Cuadro 2. Contenido de saponina en diferentes variedades de quinua en porcentaje.....	13
Cuadro 3. Análisis de varianza para la variable inhibición de <i>Botrytis</i> sp.....	47
Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable crecimiento del hongo patógeno (<i>Botrytis</i> sp.).....	48
Cuadro 5. Analisis de incidencia de <i>Botrytis</i> en campo	54
Cuadro 6. Análisis de Varianza para altura de planta.....	57
Cuadro 7. Análisis de Varianza para área foliar cm².....	60
Cuadro 8. Análisis de Varianza para biomasa total	62
Cuadro 9. Análisis de Varianza para largo de vaina.....	63
Cuadro 10. Análisis de Varianza para el variable peso de vaina.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de proceso de la saponina sobrenadante.....	10
Figura 2. Ciclo de la <i>Botrytis</i>	21
Figura 3. Conidias de <i>Botrytis fabae</i> y <i>Botrytis cinerea</i>	21
Figura 4. Aislamiento de hongos patógenos del tejido de una planta infectada	27
Figura 5. Aislamiento de hongos patógenos del tejido de una planta infectada....	28
Figura 6. Aislamiento de hongos patógenos del tejido de una planta infectada.....	29
Figura 7. Siembra por estría en placa.....	31
Figura 8. Vertido en placa.....	31
Figura 9. Extensión en placa.....	32
Figura 10. Ubicación de la zona de estudio.....	33
Figura 11. Porcentaje de incidencia de <i>Botrytis</i> de la hoja.....	40
Figura 12. Comportamiento de cada uno de los tratamientos en relación a la variable porcentaje inhibición hongo.....	47
Figura 13. Comportamiento de los tratamientos en relación a la variable crecimiento cm.....	49
Figura 14. Temperatura máxima y mínima registrada durante el periodo de estudio.....	52
Figura 15. Porcentaje de Humedad Relativa durante el periodo de estudio.....	53
Figura 16. Incidencia de <i>Botrytis</i> por tratamiento.....	55
Figura 17. Comportamiento de los bloques en relación a la variable altura de plantas a los 90 días.....	58
Figura 18. Comportamiento de los tratamientos en relación a la variable altura de plantas a los 90 días.....	59
Figura 19. Comportamiento de los tratamientos para el área foliar en cm ²	61
Figura 20. Comportamiento de los tratamientos para materia verde Kg/m ²	63
Figura 21. Comportamiento de los tratamientos para el largo de vaina cm.....	66
Figura 22. Comportamiento de los tratamientos para el peso de vaina Kg.....	68

Índice de fotos

Fotografía 1. Plantas de cultivo de haba (<i>Vicia faba</i> L.) con síntomas de <i>Botrytis</i> sp.....	44
Fotografía 2. Cultivo <i>In vitro</i> de <i>Botrytis</i> sp.....	45
Fotografía 3. Identificación de <i>Botrytis</i> sp. Vs. Barnett (Claves de identificación).....	46
Fotografía 4. Identificación de conidias de <i>Botrytis fabae</i> Vs. Conidias de Mirzaei <i>et al.</i>	46

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la mancha de chocolate o *Botrytis* (*Botrytis fabae*) es una enfermedad capaz de provocar daños de importancia en el cultivo de haba y económicos al agricultor. Es común la presencia de esta enfermedad en zonas tradicionales de producción de haba y su control es muy diverso, dando preferencia al control químico por ser el más común, pero a su vez el tratamiento que provoca daños al ambiente, salud y economía.

El factor más importante para la aparición de la *Botrytis* es la humedad, ya que es indispensable para su desarrollo. Cuanto más alto sea el grado de humedad en el ambiente, más posibilidades tendrán las plantas de contraer una infección por hongos. Como es el caso del haba, que es un cultivo a secano, es decir que se produce en épocas de lluvia presentando en esta época del año condiciones óptimas para el brote y desarrollo de esta enfermedad.

Por otra parte se debe mencionar que existen fungicidas de origen orgánico capaces de poder controlar ciertas patologías, como es el caso de la saponina que por sus propiedades químicas que serán descritas más adelante, pueden ser utilizadas para repeler patologías fúngicas.

Considerando lo anterior es que se procedió a realizar, el presente trabajo de investigación, donde se aplicó tres dosis de extracto de saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), en su forma sobrenadante con el objetivo de controlar el hongo *Botrytis* sp. bajo condiciones de laboratorio y su posterior aplicación en cultivo de haba.

Así mismo señalar que investigaciones anteriores muestran que la saponina de quinua tiene un papel de defensa contra plagas como los pájaros e insectos, a nivel de la maduración fisiológica de la planta.

1.1 Antecedentes

A lo largo de la historia se ha observado la importancia de las plantas medicinales como recurso para el tratamiento de enfermedades que afectaban a la población. A finales del siglo pasado, aun el 80% de la población mundial utilizaban extractos de plantas medicinales como remedio de numerosas enfermedades (Silva, 1997).

Por lo que se realizaron estudios en base a la extracción de saponina, triterpenos son principios activos de mayor importancia farmacéutica que presenta (*Centella asiática*). Principalmente son triterpenos pentacíclicos compuestos tipo ursano u oleano. (Silva, 1997).

Página Siete (2013), publicó que una empresa se está preparando para comercializar la saponina es Quinoa Foods SRL, dedicada a la producción de alimentos a base de quinua. El jefe comercial de la empresa, Erick Sáenz, explica que se ha determinado que existen varias empresas que utilizan este producto como fertilizante y en la industria cosmética en Bolivia.

La saponina se encuentra en la cascarilla de la quinua y es una sustancia cuyos beneficios se han comprobado en campos como la cosmética, salud, agricultura y otros. En los últimos años se han desarrollado en el país varios proyectos científicos sobre los beneficios de la saponina. Sin embargo, aún es casi desconocida y poco aprovechada.

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un cereal andino con alto valor nutricional. La quinua destaca especialmente con su elevado contenido de proteínas de alto valor biológico. El contenido y calidad nutricional de sus proteínas es mucho mayor que el de los cereales comunes, como el trigo, arroz y maíz (Robles, s/f).

Sin embargo la quinua tiene un factor que limita su uso, y esto es su contenido de sustancias amargas que se llaman saponinas. Las saponinas tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y son elevadamente tóxicas para animales de sangre fría (Robles, s/f).

A medida que transcurre el tiempo van hallándose más plantas con saponinas que pertenecen a géneros ya citados con estas. Y hay trabajos de investigación sistemática que señalan un gran número de dosis con resultado positivo. (Fontan-Candela, s/f)

Así mismo señala: Ante este hecho, si bien en algunos trabajos se citan dosis de un género ya marcado como saponico en las que no se encuentran estas sustancias, podemos suponer que el no encontrarlas en las condiciones analizadas no quiere decir que no existan en otras.

Los problemas fitosanitarios en cultivos y en especial en el cultivo de haba, se pueden manifestar a través de: plagas, enfermedades, y malezas; los cuales afectan durante el desarrollo productivo del cultivo. Uno de estos problemas es la enfermedad causada por el hongo *Botrytis* (Fontan-Candela, s/f).

El uso de fungicidas sintéticos ha originado perjuicios en los consumidores de frutos y hortalizas tratados con dichas sustancias, porque los residuos persisten en altas concentraciones, tóxicas para el ser humano. La resistencia química que tienen estos compuestos a la degradación ha causado contaminación por su acumulación de suelos, plantas, animales y en el mismo ser humano, lo que ocasiona alteraciones en los procesos bioquímicos normales y por lo tanto, graves enfermedades. Debido a todos los inconvenientes que presenta el manejo de compuestos sintéticos (Aguirre, 2012).

1.2 Justificación

Analizando la problemática y las alternativas que se tienen para el control de enfermedades es que se plantea la presente investigación con el uso de extracto de saponina de quinua, para el control de la enfermedad de *Botrytis sp*, que presento mejores resultados en anteriores investigaciones realizadas.

Así mismo se pretende generar menores egresos económicos al productor y reducir los efectos secundarios en el consumidor al ser degradado con facilidad. Dadas las bondades de las

saponinas se podría remplazar a los pesticidas químicos, los cuales si bien pueden controlar la enfermedad con el paso del tiempo causan daños ambientales, al cultivo, al suelo y también a las personas al momento de consumir estos productos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

➤ Evaluar el efecto de tres dosis de extracto de saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en su forma sobrenadante para el control del hongo *Botrytis* sp. bajo condiciones de laboratorio y en cultivo de haba (*Vicia faba* L.).

1.3.2 Objetivos específicos

- Identificar y describir el hongo *Botrytis* sp.
- Comparar la aplicación de tres dosis de extracto de saponina en su forma sobrenadante para el control del hongo *Botrytis* sp. en medio de cultivo PDA *in vitro*.
- Analizar la eficiencia de tres dosis de extracto de saponina en la forma sobrenadante para el control de la *Botrytis* causante de la mancha de chocolate.
- Determinar la eficiencia de tres dosis de extracto de saponina en la forma sobrenadante en el cultivo de haba (*Vicia faba* L.).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) como materia prima para la elaboración de un fungicida natural

2.1.1 Origen

Según Mujica Sánchez (2007), la quinoa es una planta alimenticia muy antigua en el área andina. Según algunas investigaciones, su cultivo data de 5000 años A.C. Los incas reconocieron su alto valor nutricional y las aprovecharon de modo integral, reemplazando a las proteínas animales. Actualmente, en muchas áreas siguen siendo una de las principales fuentes proteicas.

2.1.2 Taxonomía

Según Aguirre (2012), la quinoa es una planta de la familia *Chenopodiaceae*, género *Chenopodium*, sección *Chenopodia* y subsección *Cellulata*. El género *Chenopodium* es el principal dentro de la familia *Chenopodiaceae* y tiene amplia distribución mundial, con cerca de 250 dosis.

Dentro del género *Chenopodium* existen cuatro variedades cultivadas como plantas alimenticias: como productoras de grano, *Ch. quinoa* Willd. y *Ch. pallidicaule* Aellen, en Sudamérica; como verdura *Ch. nuttalliae* Safford y *Ch. ambrosioides* L. en México; *Ch. carnosolum* y *Ch. ambrosioides* en Sudamérica; el número cromosómico básico del género es nueve, siendo una planta alotetraploide con 36 cromosomas somáticos (Robles,1970).

Este género también incluye dosis silvestres de amplia distribución mundial: *Ch. album*, *Ch. hircinum*, *Ch. murale*, *Ch. graveolens*, *Ch. petiolare* entre otros (Aguirre, 2012).

Cuadro 1. Posición taxonómica de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd)

Reino	Vegetal
División	Fenerógamas
Clase	Dicotiledóneas
Sub clase	Angiospermas
Orden	Centrospermales
Familia	Chenopodiáceas
Género	<i>Chenopodium</i>
Sección	Chenopodia
Subsección	Cellulata
Especie	<i>Chenopodium quinoa</i> Willdenow

Fuente: (Aguirre ,2012)

2.1.3 Descripción botánica de la quinua

Según Mujica *et al* (2007), menciona que la quinua, es una planta herbácea anual, de amplia dispersión geográfica, presenta características peculiares en su morfología, coloración y comportamiento en diferentes zonas agroecológicas donde se la cultiva, fue utilizada como alimento desde tiempos inmemoriales, se calcula que su domesticación ocurrió hace más de 7000 años antes de Cristo, presenta enorme variación y plasticidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, se cultiva desde el nivel del mar hasta los 4000 m.s.n.m., desde zonas áridas, hasta zonas húmedas y tropicales, desde zonas frías hasta templadas y cálidas; muy tolerante a los factores abióticos adversos como son sequía, helada, salinidad de suelos y otros que afectan a las plantas cultivadas.

Su período vegetativo varía desde los 90 hasta los 240 días, crece con precipitaciones desde 200 a 2600 mm anuales, se adapta a suelos ácidos de pH 4,5 hasta alcalinos con pH de 9,0, sus

semillas germinan hasta con 56 mmhos/cm de concentración salina, se adapta a diferentes tipos de suelos desde los arenosos hasta los arcillosos, la coloración de la planta es también variable con los genotipos y etapas fenológicas, desde el verde hasta el rojo, pasando por el púrpura oscuro, amarillento, anaranjado, granate y demás gamas que se pueden diferenciar. (Robles, s/f).

2.1.4 Saponinas

Las saponinas podrían definirse como compuestos no volátiles con actividad surfactante, formados por el metabolismo secundario de gran parte del Reino Vegetal. El nombre saponina deriva del latín *sapo* que significa jabón, pues estas moléculas presentan propiedades tensoactivas, produciendo espuma en soluciones acuosas. En general, están formadas por aglicones no polares unidos a una o más moléculas de monosacáridos. Esta combinación de estructuras polares y no polares explica la capacidad tensoactiva para este tipo de compuestos (Mangas, 2009).

Químicamente, el término saponina define un gran grupo de moléculas de diferentes estructuras tales como esteroides y triterpenos glicosilados, los cuales presentan un precursor común: el óxido de escualeno (XI). La diferencia radica en que las saponinas esteroidicas han eliminado 3 de sus radicales metílicos mientras las saponinas triterpenicas los mantienen intactos, además, algunos triterpenicos no presentan el sistema policíclico característico del esterano. (Robles, 2009).

Dentro de este grupo, también se incluyen los alcaloides glicoesteroidales, estos compuestos presentan un átomo de nitrógeno intrínseco y característico de la estructura del aglicón, lo cual implicaría separados del resto del grupo. (Mangas, 2009).

Mujica & Jacobsen., (1999) las saponinas bajan la tensión superficial, poseen propiedades emulsificantes y tienen efecto hemolizante en los glóbulos rojos. Son tóxicas para animales de sangre fría. Su actividad hemolítica y antilipémica y su capacidad de bajar los niveles de

colesterol en el suero son una de sus características más importantes. No se han encontrado efectos negativos de las saponinas en la digestibilidad de las proteínas.

En estos casos, las saponinas actúan como barreras protectoras contra el ataque de patógenos y herbívoros, por lo que se justifica que las partes más vulnerables de la planta tales como hojas, tallos, frutos y raíces, sean los reservorios de este tipo de compuestos, C.Y. Cheok, *et al* mencionado por Ahumanda, 2016.

2.1.5 Beneficios de la saponina

Según Página Siete (2013), especialista en terapias para mejorar la salud a través del agua y plantas, los beneficios de la saponina son múltiples. Pero según su opinión, lamentablemente es una sustancia considerada como residuo, que en la mayoría de los casos se desecha después de pelar la quinua, proceso que contamina el agua. Según Portugal, si fuese bien aprovechada podría fortalecer la economía.

Según Página Siete (2013), “Por sus características espumosas la saponina puede ser utilizada por los bomberos para apagar incendios. Además, la saponina se está utilizando por empresas farmacéuticas en Estados Unidos y Alemania para la producción de medicamentos quimioterapéuticos para tratar el cáncer y también para la elaboración de esteroides” explica.

Las dos grandes empresas internacionales que controlan el mercado para este producto.

Según: Según Página Siete (2013),

- Puede descomponer la grasa, acelerar la absorción de nutrientes y digestión
- Efectos Anti-inflamatorios
- Efectos Antioxidantes
- Efectos anticancerígenos
- Ayuda en función eréctil.
- Revitaliza la actividad enzimática en las células apoyando el metabolismo.
- Incrementa la energía, revigoriza, ayuda a recuperación de fatiga.

- Ayuda en casos de letargo y falta de apetito.
- Mejora la proteína de síntesis del suero.
- Estimula la actividad enzimática involucrada en el proceso de reparación y construcción de hueso, e incrementa la deposición de calcio por las células de la médula ósea.
- Mejora la flexibilidad de forma significativa y baja la presión arterial.

En el crecimiento del hongo patógeno (*Cercospora beticola*) muestra que los tratamientos con saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) indica una diferencia altamente significativa a partir de las 96 horas de evaluación hasta los 144 horas, esto afirma que el extracto tiene un efecto al crecimiento del hongo in vitro. (Apaza, 2010).

Según Yanique (2012), el extracto de saponina de quinua SN reduce significativamente el crecimiento micelial del hongo *Botrytis* sp. por el método cámara húmeda *in vitro* con hojas de cultivo de haba sanas, ya que resalta la dilución 1/100 el cual puede deberse a la metodología de evaluación aplicada porcentualmente a partir de la tabla de comparaciones de Malaguti 1997.

Las saponinas en el organismo vegetal presentan una amplia gama de propiedades, las cuales incluyen desde emulsionantes, insecticidas, acción alelopática o como fitoprotectores contra ataque de microorganismos y herbívoros (Osbourn, 1996).

Las saponinas han sido intensamente estudiadas en la búsqueda de nuevas alternativas de control de enfermedades. Las de tipo monodesmisídicas presentan una alta actividad fungicida Según Osbourn, 1996; Hostettmann y Marston, 1995, (ambos citados Apaza, 2010).

2.1.6 Saponina en su forma sobrenadante

Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroide de tipo colano, se ven afectadas al pH de la solución, ya que a altos pH sufren hidrólisis, formándose saponinas de menor peso molecular (Mangas, 2009).

Las saponinas tienen una acción irritante sobre las células, como norma general, las drogas con contenido de saponina producen una acción expectorante, diurética, depurativa, tónico-venosa y disminución del colesterol. El método más exacto para la determinación de la concentración de saponinas en solución está dado por la cromatografía líquida de alto desempeño, este método indica la concentración de saponina en el perfil del extracto o solución y permite mostrar el efecto de la hidrólisis por el notable cambio de perfil (Manual técnico manejo integrado de plagas, 2001).

Según Manual técnico manejo integrado de plagas (2001), el porcentaje de Saponinas que se encuentra en las muestras del Polvo (Mojuelo = Saponina Bruta), depende de las variedades del grano de la Quínoa. Pueden resultar los porcentajes de saponina entre 20 y 50 %.

Asimismo el extracto SN también contiene compuestos fenólicos como kercetina y el kaenferol, tales compuestos tienen una reconocida actividad antifúngica casi al igual que las saponinas la actividad pueda deberse a un efecto sinérgico entre ambos grupos de saponinas y compuestos fenólicos, los cuales brindaron mejores resultados, a diferencia de los tipos de extracto Polar y Crudo los cuales no presentan compuestos fenólicos (Entrevista: Lozano, M. 2015. Características de saponinas. La Paz Bolivia).

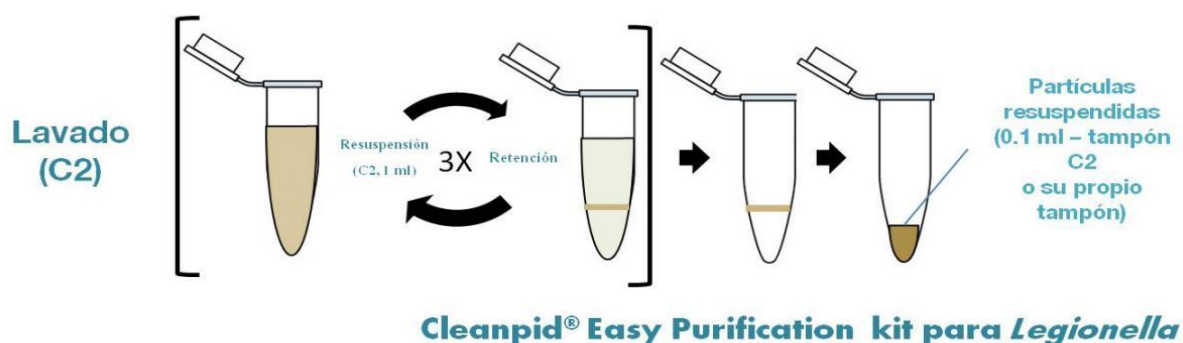


Figura 1. Ciclo de proceso de la saponina sobrenadante

2.1.7 Determinación de saponina

Según Fernández (1996), existen varias reacciones coloridas para determinar la presencia de saponinas en un extracto, y otras como la siguiente, que no necesitan de reactivos químicos para determinar su presencia:

2.1.7.1 Prueba de espuma

Según Fernández (1996), debido a que las soluciones de saponinas presentan actividad óptica, es común medir el contenido de sólidos solubles en solución utilizando un refractómetro (también conocido comúnmente como brixómetro) tal y como se hace en la industria vitivinícola. La comparación de las soluciones se hacen siempre a 1°Bx (grado brix). De tener una concentración mayor, la muestra se diluye.

Según Fernández (1996), tomar 1 ml de cada una de las fracciones (polar y apolar) en tubos de ensayo separados, añadir 9 ml de agua a cada uno. Utilizar 1 ml de esta solución en un tubo de ensayo pequeño, agitar vigorosamente por 30 segundos y dejar en reposo durante 15 minutos en la muestra. La proporción de saponinas se mide en acuerdo a la altura de la espuma sobrenadante así:

- Altura de menos de 5 mm = no se detectan saponinas
- Altura de 5 – 9 mm = contenido bajo
- Altura de 10 – 14 mm = contenido moderado
- Altura mayor de 15 mm = contenido alto

El método más exacto para la determinación de la concentración de saponinas en solución está dado por la cromatografía líquida de alto desempeño HPLC. Éste método indica la concentración de saponinas y el perfil del extracto o solución y permite mostrar el efecto de la hidrólisis por el notable cambio de perfil (Fernández, 1996).

2.1.8 Reutilización de la saponina

Página Siete, (2013), el gerente comercial de la Asociación Nacional de Productores de Quinoa (Anapqui), Miguel Choque, afirma que el 100 por ciento de la quinoa exportada por dicha institución está libre de la cascarilla. “Cuando obtenemos la cascarilla inmediatamente la volvemos a utilizar como fertilizante de la tierra en la que se volverá a cultivar el grano de oro. Ello porque refuerza los valores nutritivos de la tierra y en realidad nos falta saponina”, explica Choque.

Página Siete, (2013) “Es un insumo que tiene una amplia gama de aplicaciones. Más que nada comercializaríamos el producto en el sector industrial. Esperamos empezar a comercializarla a partir del tercer trimestre de 2013 y ya hemos identificado que nuestra principal competencia sería la saponina de Quillay, que es exportada en gran cantidad de Chile”, explica.

Según Manual técnico manejo integrado de plagas (2001), en los últimos años se han realizado al menos una decena de estudios sobre la saponina y su utilidad, algunos de ellos financiados por la Agencia Sueca de Cooperación Internacional. “A partir del mojuelo se obtiene la saponina, que se ha utilizado para la elaboración, entre otros, de ácidos oleanólicos que se emplean para tratar problemas renales y del hígado. Además se puede obtener bioetanol, un combustible”, señala la directora del instituto

Cuadro 2. Contenido de saponina en diferentes variedades de quinua en porcentaje

Variedad	Contenido en %
Blanca	0,04
Kancolla (Colorada)	0,05
Witulla	0,04
Comercial	0,25

Fuente: (Aguirre, 2012)

Stuardo *et al*, citado por Ahumada (2016), probaron la actividad antifúngica de seis extractos de saponinas de quinua crudos, puros y tratados con álcali con y sin incubación térmica en contra de *Botrytis cinérea*. Los extractos no tratados con álcali mostraron una actividad mínima en contra del crecimiento micelial de *B. cinérea* y no evidenciaron efectos en la germinación conidial, incluso a una concentración de 7 mg de saponinas/mL. En contraste, el tratamiento alcalino favoreció la actividad. Dosis de 5 mg de saponinas/mL inhibieron el 100% de la germinación conidial hasta después de 96 h de incubación a 20 °C. Ensayos con tinción demostraron que la integridad de la membrana fúngica sufrió ruptura, en los casos en que las saponinas fueron tratadas con álcali; mientras que las membranas tratadas con saponinas sin tratamiento alcalino permanecieron intactas. Con estas observaciones los autores infieren que probablemente se promueve la formación de derivados de saponinas con mayor carácter hidrofóbico, lo cual posibilitaría una mayor afinidad con los esteroides presentes en las membranas celulares y, por lo tanto, una mayor actividad.

Las saponinas se consideran como antinutricionales en los alimentos; sin embargo, estudios recientes mostraron diversas actividades biológicas favorables para la salud, entre las que se

encuentran las antibacteriana, antifúngica, disminución del colesterol y anticancerígena, entre otras (4,5). Particularmente, en las saponinas de quinua se informó la actividad antifúngica contra *Botrytis cinérea*, Wang Y, Zhang Y, Zhu Z, Zhu S, Li Y, et al. Exploration of the correlation between structure, hemolytic activity and cytotoxicity of steroid saponins. Bioorg Med Chem. 2007;15:2538-2542, citado por Apaza, 2016

2.1.9 Extractos de plantas como agentes de control

Castaño (2008), menciona que además de las bacterias y hongos que han dado buenos resultados como agentes para el control biológico de plagas se propone la aplicación de los extractos vegetales de plantas, los cuales muestran efecto positivo para este mismo fin. Es decir, algunos extractos vegetales poseen actividad antimicrobiana y fungicida que no perjudican, sino por el contrario favorecen la producción o el rendimiento de las cosechas.

Castaño (2008), menciona que las plantas han sido capaces de protegerse de las plagas por sí mismas antes de que el hombre jugara un rol activo en protegerlas.

Bautista *et al.* (2002) citado por Niurka, A; Hernández, L; Bautista, S; y Velásquez, M; 2007, mencionan que las plantas sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa.

Abou-Jawdah *et al.* (2002) citado por Niurka, A; Hernández, L; Bautista, S; y Velásquez, M; 2007. Indican que se puede utilizar otros disolventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad. Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano.

2.2 Cultivo de haba

2.2.1 .Origen de la especie

Según Cubero (1992), son originarias como cultivo del Oriente Próximo, extendiéndose pronto por toda la cuenca mediterránea, casi desde el mismo comienzo de la agricultura. Los romanos fueron los que seleccionaron el tipo de haba de grano grande y aplanado que es el que actualmente se emplea para consumo en verde, extendiéndose a través de la Ruta de la Seda hasta China, e introducido en América, tras el descubrimiento del Nuevo Mundo.

2.2.2 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Tribu: Vicieae

Género: *Vicia*

Especie: *V. faba*

Fuente: Giusti 1970, citado por Mujica *et al.* 1996

2.2.3 Cultivo del haba en Bolivia

Coca (2007), el cultivo del haba (*Vicia faba* L.) en Bolivia, se concentra en las alturas (3200-4000 msnm) y valles interandinos (2500-3200 msnm) de los departamentos de La Paz, Cochabamba, Chuquisaca, Potosí, Tarija y Oruro. Tradicionalmente este cultivo, ha estado orientado a la producción para autoconsumo. Sin embargo en los últimos años ha cobrado importancia el cultivo de algunos y ecotipos regionales (Gigante de Copacabana, Usnayo,

Esquena, etc.), por sus características de grano de calibre grande que resultan óptimos para la comercialización en los mercados internacionales.

2.2.4 Morfología

Coca (2007), tienen un tallo de coloración verde, fuerte, angulosa y hueca, ramificada, de hasta 1,5 m de altura. Según el ahijamiento de la planta varía el número de tallos. Con hojas alternas, compuestas, paripinnadas, con folíolos anchos ovales-redondeados, de colores verdes y desprovistos de zarcillos. Sus flores axilares, agrupadas en racimos cortos de 2 a 8 flores, poseyendo una mancha grande de color negro o violeta en las alas, que raras veces van desprovistas de mancha. Un fruto en legumbre de longitud variable, pudiendo alcanzar hasta más de 35 cm. El número de granos oscila entre 2 y 9. El color de la semilla es verde amarillento, aunque las hay de otras coloraciones más oscuras.

INIAF, 2000. La cosecha se puede iniciar entre los 140 y 175 días después de la siembra, la cosecha de granos verdes se hace en dos o tres pases que duran entre cuatro y cinco semanas, aproximadamente, recolectando únicamente las vainas que estén maduras, lo cual se sabe cuando, al apretarlas con los dedos, se sienten duras.

En los cultivares de variedad mayor, que producen semillas más grandes o "habones" las vainas son de menor longitud, alcanzando valores promedio iguales o inferiores a 15 cm (Tapia, 1993)

2.2.5 Importancia económica

Según Doussoulin (2010), puede emplearse tanto en consumo fresco, aprovechándose vainas y granos conjuntamente, así como únicamente los granos, dependiendo del estado de desarrollo en que se encuentren; o como materia prima para la industria transformadora, tanto para enlatado como para congelado.

2.3 Los hongos

Mascaro (1994, citado por Yanique 2012), los hongos son microorganismos eucariota unicelular o pluricelular que se clasifican en el reino vegetal, son aerobios y anaerobios facultativos se presentan como pseudomicelios, colonias filamentosas o compactas, algunos son responsables de infecciones en el hombre y animales otros producen intoxicación y otros son comestibles imperfectos *deuteromicetos* y perfectos *eumicetos*.

2.3.1 Crecimiento de hongos

Los hongos son organismos eucariotas que se engloban en el reino *Fungi* (Hongos). Son heterótrofos y requieren materiales orgánicos que utilizan como fuente de energía y como esqueletos carbonatados para la síntesis celular. Están ampliamente distribuidos por la naturaleza, encontrándose en hábitats muy diversos de ahí su frecuente aparición como alterantes en alimentos. Se reproducen de forma sexual y asexual. Presentan dos formas principales: hongos filamentosos y hongos levaduriformes; cuya estructura pueden ser pluricelular (típicamente filamentosos) o unicelular (principalmente). (Minchez, s/f)

En la actualidad, los métodos recomendados para el recuento total de hongos filamentosos y levaduras son los clásicos métodos de recuento en placa a partir de diluciones decimales seriadas de la muestra. Es posible realizar un recuento simultáneo de hongos filamentosos y levaduras ya que, dada la naturaleza filamentosa de los hongos ambos forman colonias diferentes.

Se han descrito muchos medios de cultivo para dicho recuento, pero ninguno de ellos permite el recuento de todos los de hongos filamentosos y levaduras ni en todos los alimentos (Manual técnico manejo integrado de plagas, 2001).

La norma ISO 21527 recomienda el uso del agar Diclorán Rosa de Bengala con Cloranfenicol (DRBC; *Dichloran-Rose Bengal Chloramphenicol agar*) en muestras de alimentos con una actividad de agua alta y el Diclorán 18% Glicerol (DG18; *Dichloran 18% Glycerol agar*) en las que tengan una actividad de agua inferior o igual a 0,95.

En este ejercicio, veremos el método para determinar el "Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de hongos filamentosos y levaduras por gramo de alimento" según la Norma ISO 21527 (Manual técnico manejo integrado de plagas, 2001).

2.3.2 *Botrytis fabae* mancha de chocolate

Coca (2007), señala que la mancha de chocolate es una enfermedad que afecta al cultivo del haba desde la emergencia y afecta hojas, tallos, flores, vainas verdes y granos. Es una enfermedad destructiva de las zonas de altura. El color chocolate sobre las hojas, son el síntoma característico y corresponde a la fase no agresiva del patógeno. El abundante crecimiento vegetativo, alta humedad ambiental hacen más vulnerables para el desarrollo de la enfermedad. El mejoramiento de las condiciones ambientales (enero - marzo) más favorables para el desarrollo de la enfermedad, estas manchas alcanzan a los tallos, flores y vainas, convirtiéndose en verdaderos tizones foliares de color chocolate.

Estas manchas se ven necróticas de un color más oscuro y cubiertas con abundante formación de una felpa de color gris marrón (Fase agresiva). Esta felpa está constituida por los conidióforos y conidias del hongo. Como consecuencia de la severidad de la enfermedad ocurre la caída de hojas y flores (defoliación y abscisión) (Coca, 2007).

Según López (2009), afirma que Mancha de chocolate (*Botrytis fabae*) se presenta en condiciones donde existe alta precipitación, provoca manchas de color café chocolate en los tallos, hojas, flores y vainas, agravándose (lesiones necróticas). Se puede realizar un control cultural: usar semilla certificada, desinfectar la semilla, variedades resistentes, practicar la rotación de cultivos, utilizar una densidad de siembra adecuada, recoger y eliminar el material contaminado del campo.

Las características de esta enfermedad es que se observa manchas de color chocolate sobre las hojas y posteriormente se van necrosando (secando), luego las flores y las hojas se caen, las vainas se pudren y los granos secos presentan manchas en la cáscara (Doussoulin, 2010).

Son un conjunto de pudriciones que se presentan debido a la incidencia de varios hongos dañinos que se encuentran en el suelo, generalmente en terrenos pesados y con mal drenaje y excesiva humedad (Doussoulin, 2010).

Es la principal enfermedad que afecta al cultivo de haba en las hojas, tallos, flores, vainas y granos. Este hongo se desarrolla con la humedad, ataca al cultivo desde la emergencia hasta la madurez (Coca, 2007).

El exceso de población de plantas, poco distanciado entre ellas, lluvias abundantes y suelos arcillosos con anegamiento, favorece la aparición de esta enfermedad (Coca, 2007).

2.3.3 *Botrytis cinerea* moho gris

El Moho Gris o Botrytis (*Botrytis cinerea*) es un hongo patógeno capaz de atacar a más de 220 variedades de plantas, incluso la marihuana. Se trata del hongo más común en los cultivos de marihuana, ya sea en interior, exterior o invernaderos y siempre estará más presente a finales de floración o durante el secado (Coca, 2007).

Todas las partes de la planta pueden ser atacadas: raíces, hojas, tallos, flores, frutas. La primera señal visible será un cambio en el color y en la textura de la planta. En las hojas, se traduce en una necrosis secándose rápidamente. Si el hongo ataca al tallo, éste se volverá marrón, frágil y ulcerado.

Pero lo más usual es encontrar el hongo en el cogollo. Este se volverá de un color pálido, gris, su textura cambiará rápidamente secándose y granulándose, quedando el interior del cogollo como si estuviera relleno de una capa de algodón (Cumanda, 2014).

2.4 Factores que influyen en la aparición de *Botrytis*

El factor más importante para la aparición de la *Botrytis* es la humedad, ya que es indispensable para su desarrollo. Cuanto más alto sea el grado de humedad en el ambiente, más posibilidades tendrán las plantas de contraer una infección por hongos (Cecibel, 2015).

La temperatura ideal para la aparición de la *Botrytis* es de 17° a 25°C, pero también puede aparecer con temperaturas más elevadas. Una gran diferencia de temperaturas entre el día y la noche también favorecerá la aparición del moho, porque cuando las temperaturas bajan drásticamente al final del día se da un aumento de la humedad en el ambiente (Cecibel, 2015).

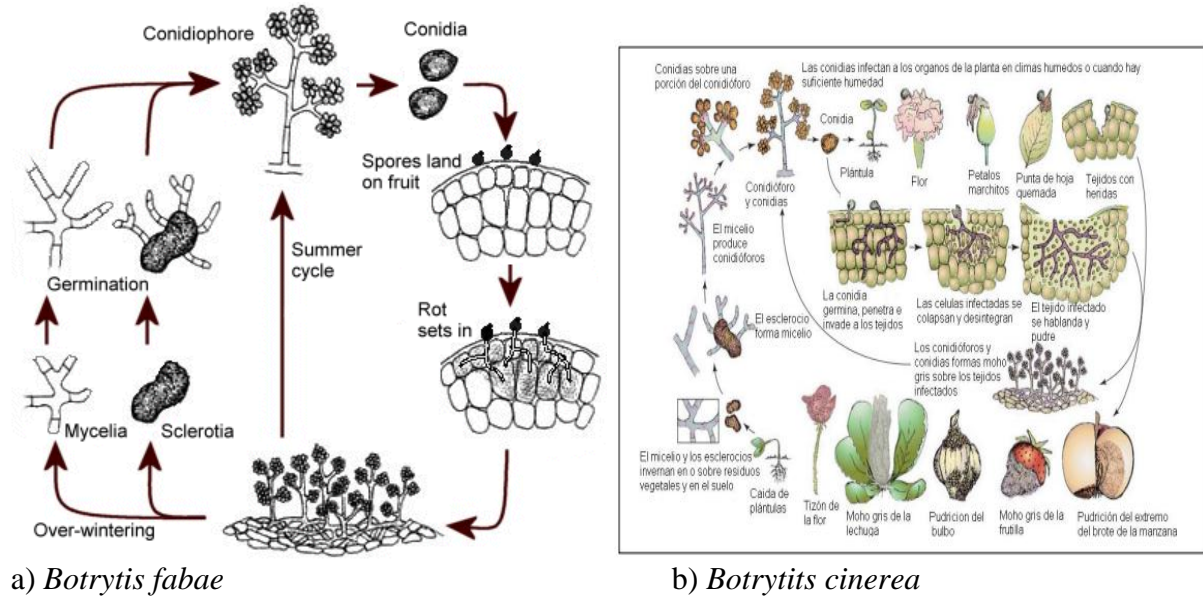
Botrytis cinérea es un hongo capaz de colonizar los tejidos vegetales sanos de las plantas (parasitismo), los ya infectados (oportunisto), y también los tejidos muertos (saprofitismo). (Cecibel, 2015).

En exterior la *Botrytis* provoca mucho daño, especialmente en aquellas cosechas más tardías. En otoño las noches son más frías y lluviosas, habiendo unas condiciones ambientales ideales para su desarrollo. Las esporas de este hongo, diseminadas por el viento, son capaces de perdurar en estado de latencia durante varios años en el suelo o el entorno, hasta que las condiciones sean favorables para su desarrollo (Cecibel, 2015).

2.5 Ciclo de la enfermedad

Según Agrios (1998), en la mayoría de las plantas sensibles, las nuevas infecciones pueden comenzar en la primavera tan pronto como las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de la enfermedad. Un clima húmedo puede ser muy favorable para la propagación de la enfermedad. Para algunas dosis de *Botrytis*, esclerocios se desarrollan en tejido vegetal muerto y la forma la etapa de hibernación del hongo. Los micelios de hongos también pueden pasar el invierno en los escombros tallo leñoso. Esclerocios luego germinar en la primavera, o

el micelio crece a partir de restos infectados y conidios (esporas infecciosas) desarrollar. Las conidias pueden ser transportadas por el viento o salpicadura de lluvias para causar nuevas infecciones en el tejido huésped susceptible”.



Fuente: Agrios 1998

Figura 2. Ciclo de la *botrytis fabae* y *Botrytis cinerea*

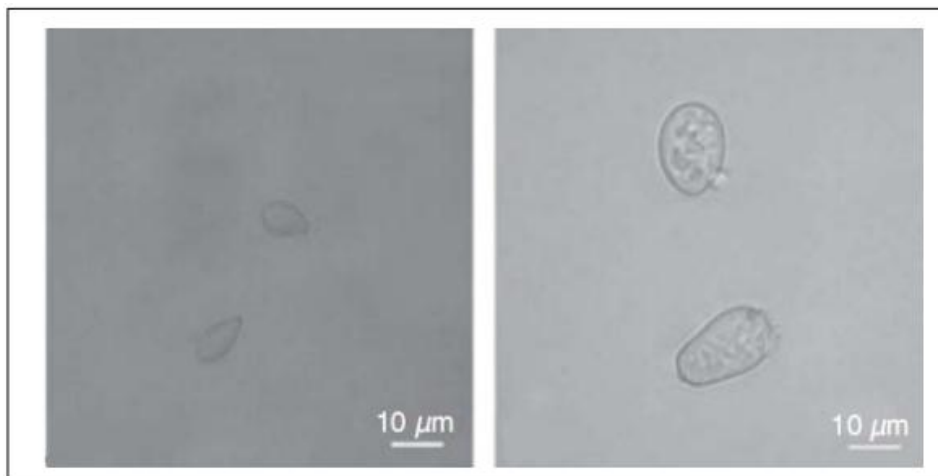


FIGURA 3 Conidias de *B. fabae* y *B. cinerea*.

FUENTE: Adaptado de MIRZAEI *et al.* (2008)

2.6 Control del ataque de *Botrytis*

INIAF (S/F) indica que entre los métodos para el control de botrytis están:

2.6.1 Termoterapia

Según Robles (s/f), se realiza por medio de la inmersión de la semilla en agua caliente (no hirviendo) durante 3 a 5 minutos, esta acción nos permite controlar algunas enfermedades que se transmiten por semilla.

2.6.2 Uso de Fungicidas

Según Robles (s/f), Se realiza con el uso de fungicidas químicos específicos, principalmente para enfermedades de pudrición del cuello de la planta. Como este hongo se desarrolla cuando la humedad es alta, será muy importante intentar mantener la humedad ambiental lo más baja posible (<50%) en floración. Se deberá dejar suficiente espacio entre las plantas para que el aire pueda circular con facilidad y la humedad no se quede estancada en el armario de cultivo. Una falta de higiene facilitará que las plantas se infecten por hongos. Es muy importante limpiar con frecuencia el cultivo, y no dejar materia orgánica o vegetal en descomposición. Además, es imprescindible no tocar los cogollos

Si la planta presenta heridas, el hongo atacará las plantas con más facilidad. Mantener las plantas en perfecto estado de salud ayudará a reducir el riesgo. Se pueden suprimir las hojas marchitas para eludir la posible aparición del hongo en la planta. Es muy importante no dejar materia muerta como trozos de ramas o partes de hojas, porque la *Botrytis* se aprovechará de esta puerta de entrada para atacar a la planta.

El mismo autor menciona que, es preferible regar por la mañana. Haciéndolo por la tarde aumentaría demasiado la humedad durante la noche. A finales de floración tendremos en cuenta el riego. Un exceso de agua sería muy peligroso y podría afectar a los cogollos

haciendo que se pudran. Esperaremos a que la tierra esté seca y la maceta muy ligera antes de regar de nuevo.

Según Robles (s/f), un exceso de nitrógeno a finales de floración también puede favorecer la aparición de los hongos, aunque cabe decir que se dan pocos casos (intentaremos que falte nitrógeno a las plantas antes de la cosecha). Como la *Botrytis* suele atacar los cogollos más grandes, una buena manera de limitar y reducir los daños será realizar una poda apical, para tener más cantidad de cogollos siendo estos de un menor tamaño y albergando menos humedad.

Cortaremos también aquellas ramas más pequeñas de debajo las plantas, teniendo en cuenta que las que estén más cerca del suelo son las que tendrán un mayor grado de humedad. En exterior se deberá evitar aquellos lugares con mucha humedad.

Según Robles (s/f), Cosecharemos las plantas cuando necesiten agua, para limitar los riesgos de podredumbre durante el secado. Secaremos las plantas en un lugar ventilado, con el fin de eludir el estancamiento de la humedad cerca de los cogollos. Sin embargo, no ventilaremos directamente la cosecha ya que un secado demasiado rápido repercute negativamente en el sabor final de las flores (sabor a verdura, debido al exceso de clorofila).

2.6.3 Control biológico de enfermedades

Según Tenorio *et al.* (2010), en Bolivia el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés desde el año 2000 comenzó con una línea de trabajo en la búsqueda y producción de biocontroladores de microorganismos con actividad biológica inhibitoria de fitopatógenos de importancia tanto agrícola como económica para nuestro país, a partir del año 2007 el Instituto de Investigaciones en Productos Naturales se incorpora en la búsqueda de bicontroladores pero a partir de productos naturales aislados de plantas y dosis liquenicas. Se estudiaron específicamente el control de fitopatógenos del haba

y de la papa, a través del screening de los hongos del cepario del I.I.F.B. y dosis vegetales seleccionadas por quimiotaxonomía, con posible actividad biológica contra estos patógenos.

2.6.4 Control con métodos naturales

Según Minchez (s/f), consiste en el uso de todas las formas de combate de modo compatible y en forma complementaria, procurando el uso mínimo de agroquímicos para evitar la destrucción de microorganismos útiles en el combate. No causar la contaminación ambiental con el uso indiscriminado de Fungicidas químicos. En la actualidad en el país, se ha puesto en práctica el uso del control natural o Ecológico, recurriendo a la identificación de otras alternativas de uso y acceso local, como por ejemplo diversas plantas identificadas con efectos tóxicos.

Entre las principales actividades que los productores realizan para eliminar a las enfermedades son las labores culturales, podemos mencionar: la rotación de cultivos, preparación del terreno, uso de semillas de calidad, tratamiento de semillas, control de malezas, dar buen distanciamiento entre plantas, eliminación de plantas enfermas, siembra en épocas distintas, deshierbes, aporques y descanso del terreno. Pero también existen prácticas con el uso de plantas o preparados naturales que pueden actuar como plaguicidas (Minchez, s/f).

2.7 Extractos vegetales

Minchez (s/f), señala que son constituyentes odoríferos, volátiles, aromáticos por varias sustancias de origen terpenico, que son generados por la ruta biosintética, comúnmente elaborado por el plasma, vertidos en la vacuola y secretados por esta al exterior de la planta. Son conocidos desde la antigüedad pero han sido apartados durante mucho tiempo por los fungicidas convencionales hasta que ahora vuelven cada vez con más fuerza.

Hoy en día se conocen mejor los usos y dosis de los fungicidas naturales, a la vez que son fáciles de manejar y que muchas de estas plantas las podemos cultivar o recolectar fácilmente.

Los extractos naturales en dosis altas son más eficientes en control de la mancha de chocolate con relación a los extractos de bajo dosis (Minches, 2001).

2.7.1 Ventajas y desventajas de los extractos vegetales

a) Principales ventajas

- Por ser biodegradables no producen desequilibrios en el ecosistema, al ser de origen vegetal estos bioplaguicidas provocan un impacto mínimo sobre la fauna benéfica, son efectivos contra enfermedades y no tienen restricciones toxicológicas.
- Son conocidos por el agricultor ya que generalmente se encuentran en su medio.
- La mayoría de los extractos tiene diversos usos, como lo es el caso de aquellos empleados por sus propiedades terapéuticas y efectos repelentes, entre otros.
- Su rápida degradación disminuye el riesgo residual en los alimentos.
- Muchos de estos compuestos no causan fototoxicidad.
- Otorgan cierta independencia del agricultor sobre todo cuando se utilizan preparados caseros a base de plantas.
- Se requieren de otros adherentes para su aplicación También pueden ser peligrosos para la salud de las personas.
- Su acción es rápida y efectiva solo si es aplicado en el momento oportuno.
- No se mezclan con facilidad con el agua.

FUENTE: (Agrios, 1997).

b) Principales desventajas

- No puede ser almacenado por mucho tiempo
- Pierde su efectividad con el tiempo
- Se requieren cantidades mayores para su aplicación

FUENTE: (Agrios, 1997)

2.7.2 Plantas que se pueden utilizar para la elaboración de extractos naturales.

Aguirre (2012), señala que es conveniente no utilizar plantas que estén en vías de extinción, difíciles de encontrar. Las características que debe tener la planta bioplaguicida ideal son:

- Ser perenne.
- Estar ampliamente distribuida y en grandes cantidades en la naturaleza, o bien que se pueda cultivar.
- El órgano aprovechable de la planta debe ser renovable, como hojas, flores o frutos.
- No ser destruida cada vez que se necesite recolectar (evitar el uso de raíces y cortezas).
- Requerir poco espacio, manejo, agua y fertilización.
- No debe tener un alto valor económico.

2.7.3 Aplicación con Productos Fitosanitarios

El manejo y la aplicación de productos fitosanitarios, implica riesgos de toxicidad tanto para personal al manipularlo como para el consumidor, así como la reducción del impacto sobre las distintas faunas y el medio ambiente también el aumento de la eficacia contra la plaga o enfermedad que se desea combatir. Para ello es necesario seguir de forma general una serie de normas de salud, seguridad y condiciones de trabajo. Además de la propia naturaleza del producto, depende del tipo de parásitos, de su estado de desarrollo, de la dosis aplicada, del momento de la aplicación y del correcto funcionamiento de las máquinas y/o mochila aspersor (Minchez, s/f).

Huici (2004), señala que primero se selecciona una superficie de 100 m cuadrado, luego cargue una mochila de 10 L de agua, luego fumigue los 100 m², y vea cuanto de agua ha utilizado en esos 100 m², repita esta operación 3 veces La dosificación es la que nos permite conocer las dosis o la cantidad de fungicida que se debe poner en nuestra mochila aspersor, no más ni menos.

2.8 Medios de cultivo y reactivos

2.8.1 Aislamiento a partir de hojas

En caso de que la infección de las hojas de una planta avance en forma de tizón o mancha foliar fungosa y en el caso de que las esporas del hongo aparezcan sobre la superficie, algunas de estas esporas deben depositarse sobre una caja Petri que contenga medio de cultivo. Si el hongo crece en cultivo, al cabo de unos cuantos días aparecerán colonias de micelio aisladas debido a la germinación de las esporas (Agrios, 1997)

Sin embargo, el método más común para aislar a los patógenos de las hojas infectadas y de otros órganos de la planta es aquel en el que se seleccionan varios cortes pequeños de 5 a 10 mm² a partir del borde de la lesión infectada, a fin de que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos (Agrios, 1997).

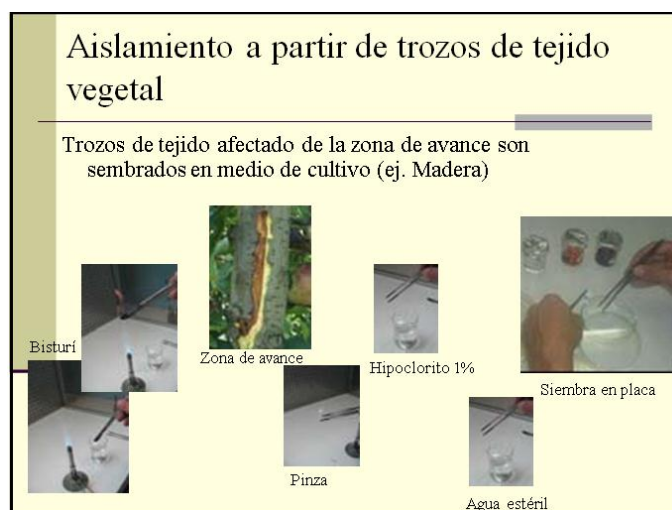


Figura 4. Aislamiento de hongos patógenos del tejido de una planta infectada (Agrios, 1997).

Esos cortes se colocan en una de las soluciones esterilizantes de superficie, y al cabo de 15 ó 30 segundos los cortes se toman asépticamente uno por uno a intervalos regulares de tiempo (por ejemplo cada 10-15 segundos), con el objeto de que cada uno de ellos se esterilice (a nivel de la superficie) a diferente tiempo.

Posteriormente los cortes se secan con trozos limpios de papel estéril o se pasan por tres cambios con agua estéril, y por último se colocan sobre el medio nutritivo (generalmente, de 3 a 5 por caja de Petri) (Agrios, 1997).

Los cortes esterilizados en su superficie durante menos tiempo generalmente contienen al patógeno y a varios contaminantes, mientras que los que se han esterilizado durante más tiempo no permiten el desarrollo de cualquier tipo de microorganismos debido a que han sido destruidos por el esterilizante de superficie. (Agrios, 1997).

Sin embargo alguno de los cortes depositados en el esterilizante de superficie durante periodos de tiempo intermedios permitirán que sólo el patógeno se desarrolle y forme colonias puras en el cultivo, ya que ha permitido que el esterilizante actúe el tiempo suficiente para destruir a todos los contaminantes de superficie, pero no el tiempo necesario para destruir al patógeno, el cual se ha propagado desde el tejido enfermo hasta el tejido sano. (Agrios, 1997).



Figura 5. Aislamiento de hongos patógenos del tejido de una planta infectada (Agrios, 1997).

Posteriormente las colonias del patógeno se re-siembran asépticamente para su posterior estudio. El método de dilución seriada con frecuencia se utiliza para aislar bacterias patógenas de tejidos enfermos contaminados por otras bacterias.

Después de haber efectuado la esterilización superficial de los cortes de tejidos enfermos a nivel del margen de la infección, los cortes se muelen asépticamente (pero con bastante cuidado) en un pequeño volumen de agua estéril y posteriormente parte de este homogeneizado se diluye serialmente en volúmenes iguales o diez veces más el volumen de agua inicial (Agrios, 1997).

Por último, las placas con agar nutritivo se siembran con un asa que ha sido mojada en cada una de las distintas diluciones seriadas, con el fin de que en ellas se desarrollen colonias individuales de la bacteria patógena a partir de las diluciones más altas que todavía contengan bacterias (Agrios, 1997).

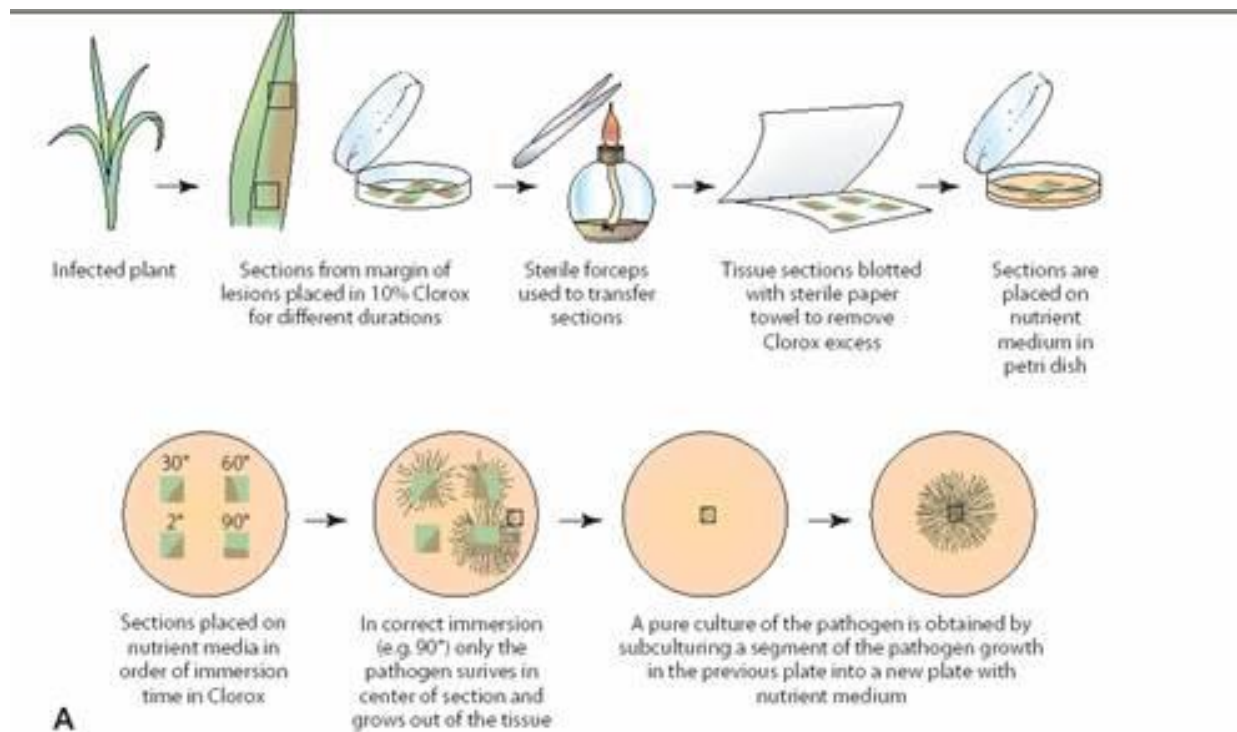


Figura 6. Aislamiento de hongos patógenos del tejido de una planta infectada (Agrios, 1997).

2.9 Aislamiento a partir de tallos, frutos, y otros órganos aéreos de la planta.

La mayoría de los métodos que se han descrito para aislar bacterias y hongos patógenos de las hojas, pueden también utilizarse para aislar esos mismos patógenos de las infecciones superficiales de los tejidos mencionados (Agrios, 1997).

2.9.1 Aislamiento a partir de raíces, tubérculos, raíces carnosas y frutos de hortalizas que se encuentran en contacto con el suelo, etc.

El aislamiento de los patógenos de cualquier tejido vegetal enfermo que se encuentre en contacto con el suelo, presenta una serie de problemas adicionales que ocasionan numerosos organismos saprófitos que invaden el tejido después de que ha sido destruido por el patógeno (Agrios, 1997).

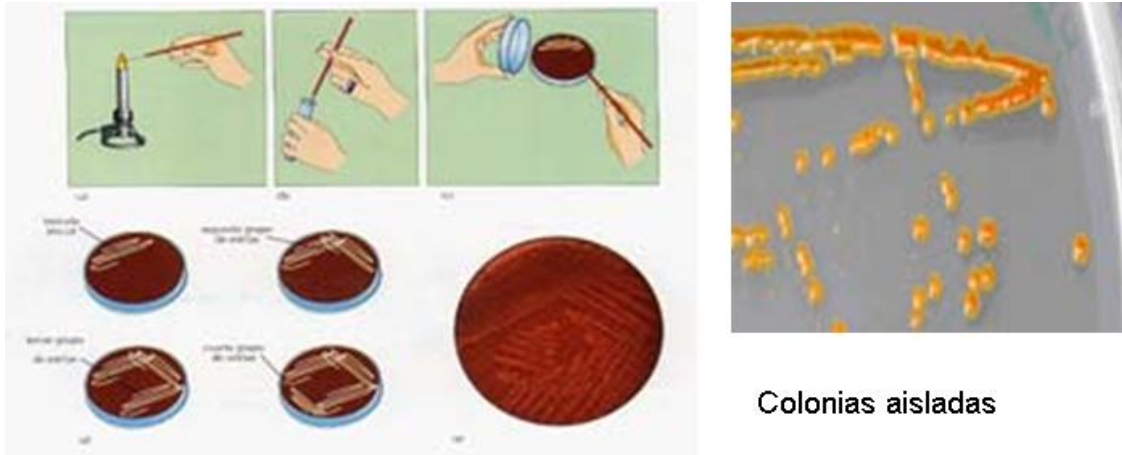
2.9.2 Métodos de aislamiento

Para aislar células individuales, los microorganismos han de ser diluidos, debido al número en que normalmente están presentes (Agrios, 1997).

La disolución se realiza, normalmente por un de los siguientes sistemas:

- **Siembra por estría en placa**

Para que se pueda contar el número de colonias en placa debe estar entre 30 y 300.



Colonias aisladas

Figura 7. Siembra por estría en placa

- **Vertido en placa**

0,1 ml. De la solución se siembra en superficie y se esparce mediante rastrillo de vidrio (Agrios, 1997).

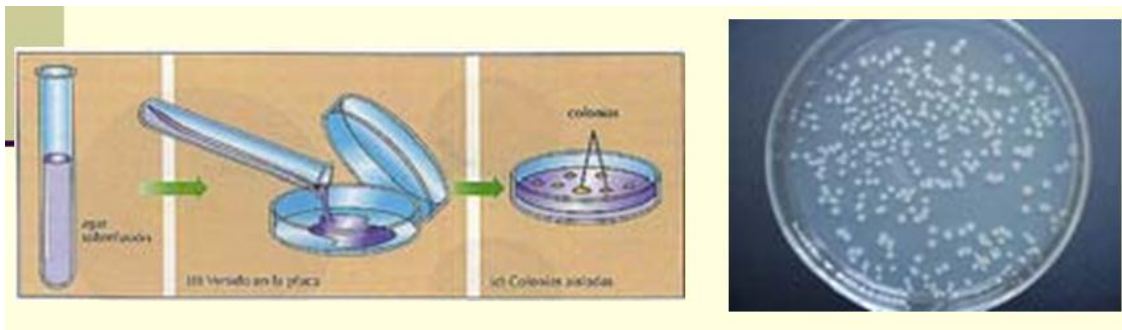


Figura 8. Vertido en placa

- **Extensión en placa**

A partir de una suspensión concentrada de microorganismos se realizan diluciones seriadas (Agrios, 1997).

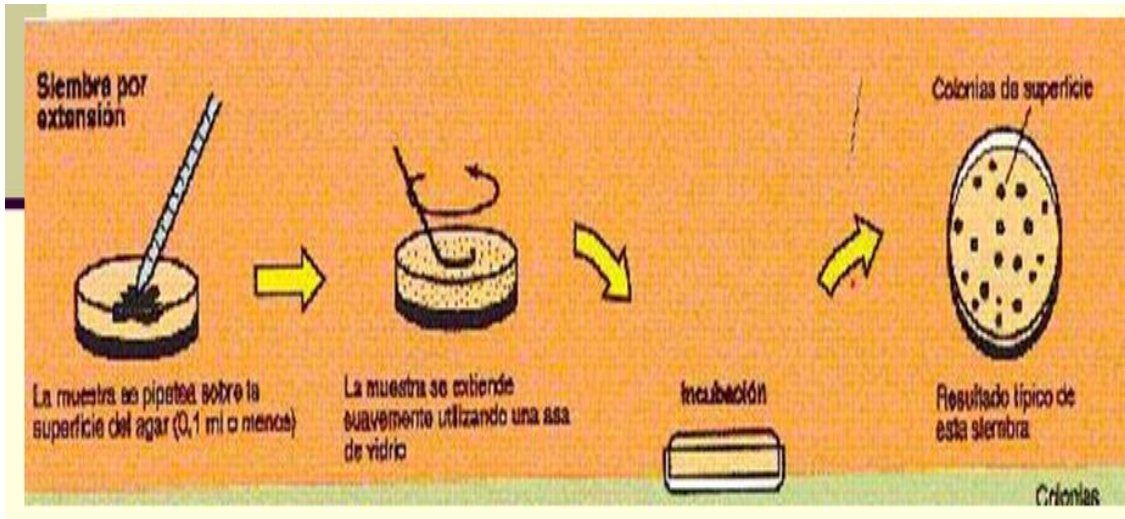


Figura 9. Extensión en placa

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El presente trabajo se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio y en cultivo de haba en los predios del Municipio de Chicani del departamento de La Paz.

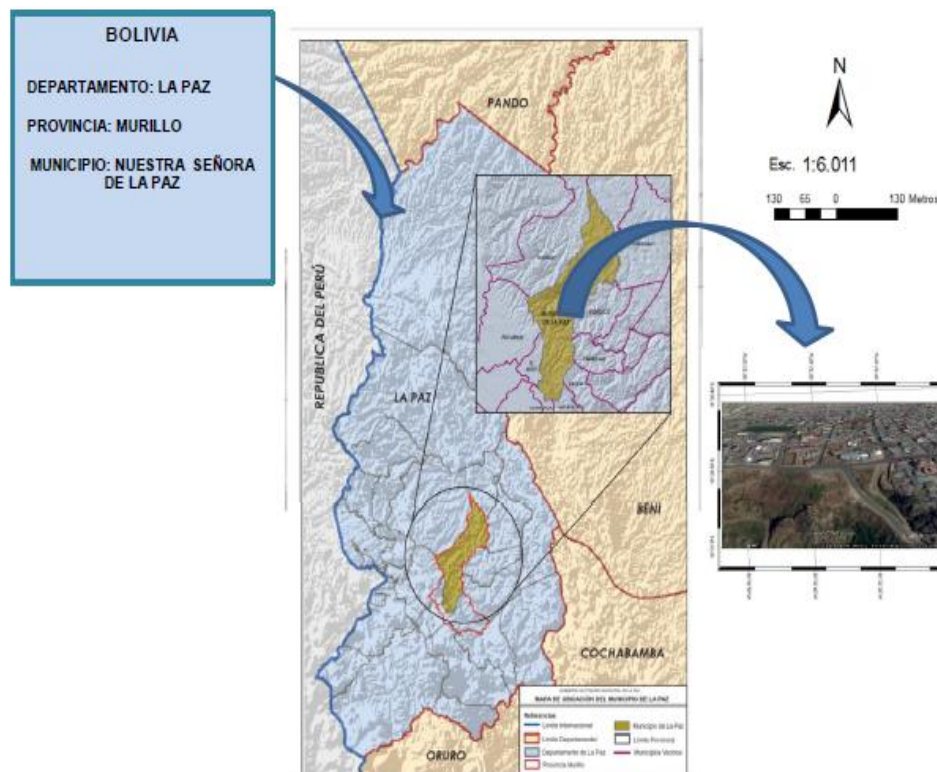


Figura 10. Ubicación de la zona de estudio

Chicani tiene un clima de cabecera de valle, los veranos son calurosos con temperaturas que alcanzan 18 °C; en la época invernal la temperatura puede bajar hasta - 4 °C, en los meses de agosto y noviembre se presentan vientos fuertes de Noreste a Este. La temperatura media es 9°C; con una precipitación media de 380 mm, (Meteoret, 2013).

3.2 Materiales

Los materiales utilizados durante el trabajo de investigación se detallan a continuación

3.2.1 Materiales de laboratorio

- | | | |
|-------------------------------|---|----------------------------|
| 1. Material de vidrio: | - Matraz aforado | - Probeta |
| | - Vasos de precipitados | - Cajas petri |
| | - Tubos de ensayo | - Viales |
| | - Portaobjetos | - Tubos de hemólisis |
| 2. Equipos: | - Balanza análisis | |
| | - Autoclave | |
| | - Microscopio | |
| 3. Reactivos: | - Trozos de papa pelada | - Azul de lactofenol |
| | - Glucosa | - Gentamicina |
| | - Agar | - Agua destilada |
| | - Alcohol | - KH_2PO_4 |
| | - Lavandina | - Glicerol |
| 4. Otros materiales: | | |
| | - Campana | - Hornilla eléctrica |
| | - Pinza y asa | - Tips |
| | - Micropipetas | - Algodón |
| | - Parafilm | - Cinta adhesiva (scotch) |
| | - Toalla pequeña | - Marcador indeleble |
| | - Material de limpieza | - Material de escritorio |
| | - Guardapolvo | - Mechero bunsen |
| | - Papel filtro (papel higiénico blanco) | |

3.2.2 Material Vegetal

Se seleccionó semilla de haba variedad Gigante de Copacabana la más utilizada en la zona por sus rendimientos y preferencia al momento de la venta.

La saponina de quinua fue provista por el laboratorio de la UMSA, Instituto de Investigación Fármaco Bioquímica (IIFB) de la ciudad de La Paz. En su forma sobrenadante al 42,5% bajo las siguientes dosis: 1/100, 1/1000, 1/10000.

3.2.3 Material de gabinete

- Computadora
- Calculadora
- Fotocopias
- Claves de identificación
- Cuaderno de apuntes

3.3 Metodología

La metodología de carácter experimental se dividió en tres fases que se detallan a continuación:

3.3.1 Fase 1. Recolección e identificación del hongo en campo

En esta fase de campo, se ingresó al cultivo de haba existente en el lugar donde posteriormente se realizó la investigación, y se procedió a identificar plantas con síntomas de posible daño a causa de *Botrytis* y su posterior recolección de partes de hojas y tallos en bolsas plásticas para ser llevadas a laboratorio para su aislamiento e identificación.

3.3.2 Fase 2. Aislamiento del hongo y tratamiento con saponina

a) Aislamiento del hongo.

Las partes de hojas y tallos recolectados fueron llevados a laboratorio para realizar el siguiente trabajo:

- Esterilización

Para trabajar con microorganismos es indispensable mantener un medio de cultivo puro, siendo el primer paso la esterilización del material de vidrio y los medios de cultivo.

Se vertió agua necesaria en el autoclave y se encendió para el calentamiento del agua, mientras se preparó todo el material para autoclavar se cerró para esperar que la aguja del manómetro subiera a 1,5 atmósferas y 121°C y se esperó desde ese momento 15 min.

- Aislamiento

Se prepararon soluciones de alcohol al 99 %, 97 % y 95 % para la desinfección de la superficie del tejido infectado.

Preparación del material vegetal:

Este material vegetal fue desinfectado con alcohol a tres diferentes concentraciones de la siguiente forma:

Se sumergió los tallos y hojas en alcohol al 99% por 10 minutos, 97% por 5 minutos, 95 % por 3 minutos para la desinfección de la superficie del tejido infectado. Se lavó con agua para la posterior siembra.

Una vez limpio el material, se cortaron trozos de tamaño adecuado para sembrar. Se realizaron los cortes en la parte del tallo y hojas donde el hongo se encontraba más activo y trozos de hojas para ver la actividad del patógeno.

- Siembra en medio de cultivo:

El medio de cultivo usado para el aislamiento de fitopatógenos fue Agar papa dextrosa PDA. Se mezcló 25 gr de papa, 1 gr glucosa y 1,5 gr de Agar en 100 ml de agua destilada, se dejó hervir la papa y el agua en hornilla y se mezcló la glucosa y Agar para luego esterilizar en autoclave.

Partes de plantas afectadas que fueron desinfectadas fueron sembradas directamente en medio cultivo PDA (Agar PDA) para observar el desarrollo del patógeno.

- Purificación de hongos

Después de dos días se observó el crecimiento de hongos y se procedió a la purificación con el método de punta de hifa, que se detalla a continuación:

Se sembraron por separado porciones de cada hongo encontrado en medios de cultivo Agar papa Dextrosa PDA, con gentamicina 75 microlitros por cada 100ml.

En cuanto desarrollaron las hifas se cortaron de cada medio de cultivo sembrado, en la parte de la célula terminal con un bisturí desinfectado en alcohol.

Se cortaron también trozos de Agar que contenían hifas y se transfirieron en placas con medios frescos. Para incubar por tres a cinco días como recomienda el Manual de Aislamiento de Hongos Fitopatógenos IIFB (2001), hasta el desarrollo de la colonia fúngica.

- **Lavado de esporas**

El lavado de esporas se realizó en las cajas donde los hongos se encontraban completamente aislados; con la ayuda de una micropipeta se lavó con 4 ml de Buffer Tankuay, se colocó una porción de esta solución en cámara de Neubauer para recontar en las cuatro esquinas y el medio hasta llegar a una concentración de 1×10^6 esporas por ml como sugiere el Manual de Aislamiento de Hongos Fitopatógenos IIFB (2001), para luego depositar en viales herméticamente cerrados y en refrigeración.

- **Identificación**

Examen macroscópico en placa

Una vez que el hongo creció 2 cm de su punto de origen, o antes de que pudiera hacer contacto con los hongos de las otras siembras en la placa se trasplantó individualmente en placas con medio de cultivo Agar PDA fresco y finalmente cuando se observó que las cepas crecieron sin la contaminación de otros se trasplanto a tubos de pico de flauta.

Una vez que desarrollo en medio de cultivo sólido en caja o en tubo presentó ciertas características que fueron observadas antes de la identificación microscópica para determinar el género al cual pertenecen.

Procedimiento

Se tomó la caja petri o el tubo donde se desarrolló el micelio y se observó:

Anverso: Aspecto del frente hifal: vellosa, seco, algodonoso, etc.

Formación de macroestructuras sexuales

Color: de la especie fúngica

Reverso: Aspecto del frente hifal: rugoso, liso

Pigmento: Presente, no presente

Examen microscópico por tinción

Procedimiento

Se colocó una gota de azul de metileno sobre un portaobjeto.

Un trozo de cinta adhesiva o Scotch transparente fue apoyado sobre la superficie de la colonia.

Se adhirió esta cinta que contenía el micelio a los dos días, sobre la gota colocada sobre un portaobjetos.

Se observó en el microscopio utilizando primero el aumento 10X para detectar la forma y ordenamiento característico de las esporas, posteriormente para observar más detalladamente con el aumento de 40X.

b) Tratamiento de *Botrytis* con saponina

En esta fase, se procedió en cajas Petri a la aplicación de las tres dosis de saponina en su forma sobrenadante sobre el hongo *Botrytis* para observar su eficiencia para el control del patógeno.

De la siguiente manera:

Preparación de la solución saponina sobrenadante en cultivo *In vitro*.

Para realizar el tratamiento de *Botrytis* con las dosis de saponina sobrenadante, se prepararon en un matraz de 250ml solución de Papa Agar Dextrosa PDA. Se mezcló 25 gr de papa, 1 gr glucosa, 1,5 gr de Agar y gentamicina 75 microlitros par evitar el desarrollo de bacterias en 100 ml de agua destilada, se dejó hervir la papa y el agua en hornilla y se mezcló la glucosa y Agar para luego esterilizar en autoclave.y se procedió a pesar las cantidades de dosis de saponina de acuerdo a los tratamientos para ser incorporados en la solución PDA. Luego se procedió a plaquear las cajas Petri con los tratamientos propuestos (1/100, 1/1000, 1/10000 y sin saponina) y sus repeticiones.

Inoculación del hongo *Botrytis* en cultivo *In vitro* con dosis de saponina

En las cajas Petri con medio de cultivo Agar PDA y los tratamientos con saponina respectivos preparados. Se procedió en la cámara de flujo laminar y con la ayuda de tips a cortar pequeñas porciones de Agar en el centro de las cajas petri.

Con la ayuda de un asa estéril se retiraron las porciones cortadas, para poner en el lugar vacío muestras de 0,5cm de diámetro aproximadamente del hongo *Botrytis* aislado e identificado previamente. Para luego ser selladas con parafilm para evitar su contaminación y su etiquetado correspondiente.

Las cajas Petri fueron conservadas en lugar bajo condiciones ideales para su desarrollo y realizar la medición del crecimiento del patógeno. Para esto se midió con la ayuda de una regla el diámetro de desarrollo cada día durante cinco días de realizada la inoculación. De esa manera se comparó la eficiencia de control de cada tratamiento con saponina.

3.3.3. Fase 3. Aplicación del tratamiento en el cultivo de haba en campo

En esta fase del estudio se realizó la aplicación de saponina sobrenadante en tres dosis con un testigo sin tratamiento en campo para evaluar la eficiencia de control de la enfermedad *Botrytis* sobre el cultivo de haba.

En esta etapa se realizó la preparación del terreno para la implementación de las parcelas de la siguiente manera:

- Preparación del terreno

El suelo escogido para este estudio se preparó haciendo la remoción a una profundidad de 30cm. aproximadamente; de esta manera el terreno quedó suelto para poder realizar fertilización con abono, nivelación y preparar la siembra.

- **Delimitación y armado de parcelas**

Se delimito las parcelas de siembra o unidades experimentales de 2m por 2m cada una, en total 12 parcelas, haciendo un total de 66,5m² de terreno para investigación. Con espacios de 0,5m para pasillo y delimitación entre unidades experimentales.

- **Siembra**

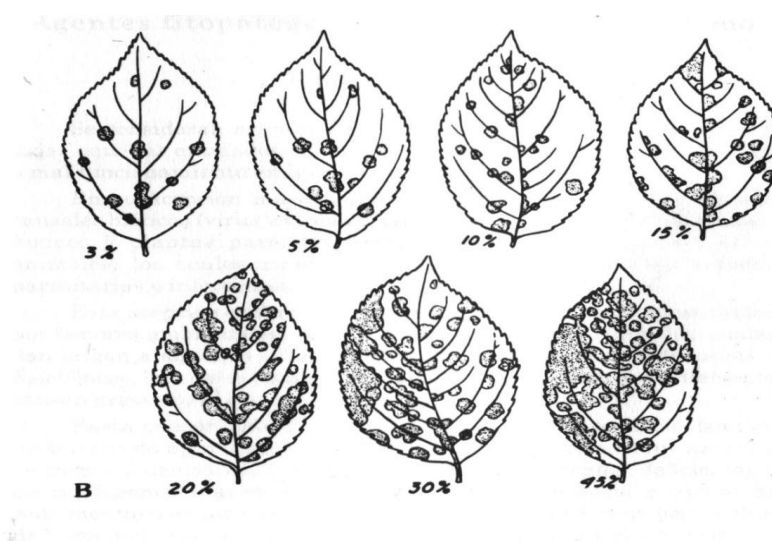
Por cada unidad experimental se sembró 24 plantas a una distancia de 35cm entre plantas y de 60cm entre surcos, sistema de siembra utilizado en la zona.

- **Aplicación de tratamientos.**

Durante el ciclo fisiológico del cultivo se realizaron tres aplicaciones foliares con las tres dosis de saponina en su forma sobrenadante, en una cantidad de producto entre 60 a 80ml/m², en las unidades experimentales delimitadas bajo el diseño experimental propuesto. Esto con la ayuda de una mochila de asperjar de 5 litros. En horas de la mañana.

- **Evaluación de incidencia**

Para la evaluación de la enfermedad se observó la incidencia por planta, 5 muestras por unidad experimental del hongo patógeno *Botrytis* sp., se evaluó bajo la tabla de comparaciones propuesta por Goidanich 1959, citado por Malaguti 1997, expresándola en porcentaje.



Fuente: Goidanich 1959, citado por Malaguti 1997:.,59.

Figura 11. Porcentaje de incidencia de *Botrytis* la hoja.

3.4 Diseño experimental

El diseño experimental para la fase de campo que se utilizó fue el de bloques completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones.

Los tratamientos de desinfección fueron:

- TRAT. 1 → Aplicación foliar con saponina Sobrenadante dosis 1/100
- TRAT. 2 → Aplicación foliar con saponina Sobrenadante dosis 1/1000
- TRAT. 3 → Aplicación foliar con saponina Sobrenadante dosis 1/10000
- TRAT. 4 → Testigo sin saponina

Los cuales fueron sorteados aleatoriamente a cada bloque (repetición).

3.4.1 Características de la unidad experimental

En campo las unidades experimentales fueron de 2 m², en cada unidad experimental se sembró 24 plantas a una distancia de 35cm entre plantas y de 60cm entre surcos. Se realizaron las labores culturales necesarias que el cultivo requirió.

3.4.2 Modelo lineal

La presente investigación se trabajó con el diseño experimental de diseño Bloques Completamente al Azar (DCA) con 4 tratamientos y 3 repeticiones. Con el respectivo análisis de varianza (ANVA) y se compararon con DUNCAN (P<0,05).

El modelo lineal que se aplicó al diseño experimental planteado es el siguiente

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

X_{ijk} = observación cualquiera

μ = media general del experimento

α_i = efecto del i-esimo tratamiento

β_{φ} = efecto del k-esimo bloque

ε_{ij} = error experimental

Distribución espacial

		TRATAMIENTOS (TRAT.)			
		Aplicación Foliar con Saponina Sobrenadante			
REPETICIONES	R1	R1 TRAT.1	R1 TRAT.2	R1 TRAT.3	To
	R2	R2 TRAT.2	R2 TRAT.1	To	R2 TRAT.3
	R3	To	R1 TRAT.3	R3 TRAT.1	R3 TRAT.2

3.5 Variables de respuesta

Se determinaron las siguientes variables de respuesta:

- Identificación y aislamiento de patógeno.
- Medición de la dinámica de crecimiento del hongo patógeno (*Botrytis sp*) frente a las tres dosis del extracto de saponina sobrenadante *in vitro*.
- Porcentaje de inhibición de *Botrytis sp*. frente a las tres dosis de saponina en su forma sobrenadante aplicado en el cultivo del haba (*Vicia faba L.*), aplicando la tabla de comparaciones de Malaguti.
- Determinar la efectividad de cada uno de los tratamientos evaluando altura, área foliar, materia verde, largo de vaina y peso de vaina del cultivo de haba (*Vicia faba L.*)
- Incidencia de *Botrytis* en plantas.

3.6 Parámetros de evaluación

Estos parámetros de evaluación se realizaron diferenciando los tratamientos de la investigación en laboratorio y en campo

3.6.1 Identificación del agente causal de mancha de chocolate

Para determinar el agente causal o patógeno de la mancha de chocolate; se tomó como parámetro de evaluación: la recolección de órgano de plantas de cultivo de haba con síntomas posibles de enfermedad. Mediante análisis de laboratorio se determinó el agente causal de esta enfermedad mediante claves de identificación de Barnett (1972).

3.6.2 Incidencia de *Botrytis*

Para el porcentaje de incidencia de *Botrytis sp.* frente a las tres dosis de saponina en su forma sobrenadante aplicado en laboratorio se realizó con la medición de la dinámica de crecimiento del hongo patógeno (*Botrytis sp*) y para campo en el cultivo del haba (*Vicia faba L.*), aplicando la tabla de comparaciones de Malaguti.

3.6.3 Evaluación de las tres dosis y su efecto en el cultivo

Se evaluaron en campo las variables de altura, área foliar, materia verde, largo de vaina, peso de vainas y rendimiento; para constatar la eficiencia de cada tratamiento de saponina a tres dosis diferentes con tres aplicaciones durante el ciclo del cultivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se expresan los resultados de la evaluación de las diferentes variables puestas en estudio, durante el transcurso del presente trabajo experimental, denotando la importancia del control de *Botrytis* en el cultivo de haba (*Vicia faba* L.) con tres dosis de extracto de saponina sobrenadante, evaluadas en el municipio de Chicani, en el segundo semestre agrícola del 2015 entre los meses de octubre a marzo del 2016. Los resultados y discusiones se presentan en la siguiente secuencia:

4.1 Resultados primera fase recolección e identificación del hongo en campo

La identificación en campo de la enfermedad de mancha de chocolate se realizó de acuerdo a los síntomas visibles que se presentó en las plantas de cultivo de haba en los predios de Chicani, en la fotografía se muestra esta identificación:



Fuente: Flores, 2015

Fotografía 1. Plantas de cultivo de haba (*Vicia faba* L.) con síntomas de *Botrytis* sp.

4.2 Resultados segunda fase laboratorio

4.2.1 Identificación de hongos fitopatógenos

a) Examen macroscópico de la *Botrytis fabae*.

Los resultados obtenidos en laboratorio mediante claves de identificación según Barnett (1972), Agrios (2005) y Coca (2017), por aislamiento de colonias puras que se realizó se pudo evidenciar la presencia de *Botrytis fabae*, presentando micelio de color café en la fase no agresiva y una felpa blanquecina en la fase agresiva sobre el cultivo PDA que es el color típico de *Botrytis fabae*, Agrios (1996). Causante de la mancha de chocolate. Al mismo tiempo en el aislamiento se encontraron hongos como el *Aspergillus* sp., *Penicillun* sp. y *Mucor* sp. (Ver Anexos).

La identificación se realizó por observaciones macroscópicas y microscópicas según las normas del Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas U.M.S.A., que se detallan a continuación:



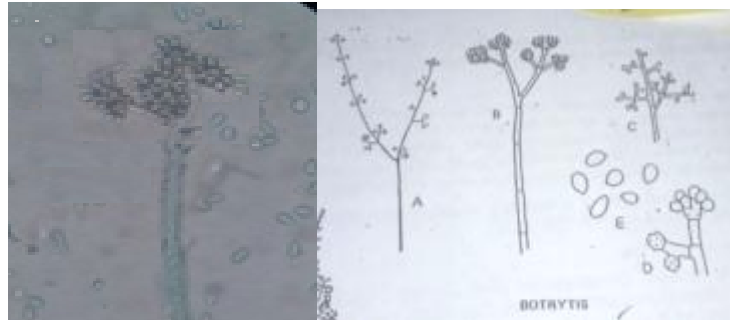
Fuente: Flores, 2015

Fotografía 2. Cultivo *in vitro* de *Botrytis* sp.

b) Examen microscópico de la *Botrytis fabae*.

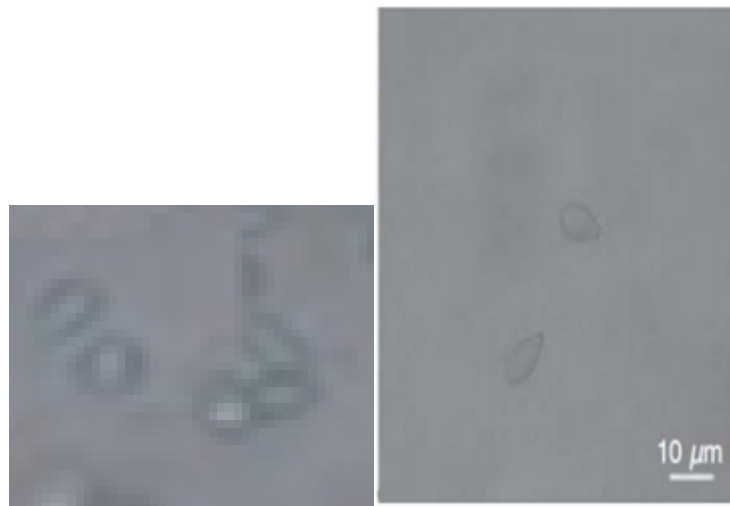
En la observación hecha al microscopio con un aumento óptico de 40x se encontraron gran cantidad de hifas, conidióforos variables, ramificada irregularmente, hifa con conidióforos y

conidias en forma de racimos como "Racimos de uva" y conidias sueltas. Estas características encontradas en la observación microscópica fue similar a las claves de identificación mencionadas por Barnett (1972).



Fuente: Flores, 2015 Fuente: Barnett, 1972

Fotografía 3. Identificación de *Botrytis sp.* Vs. Barnett (Claves de identificación)



Fuente: Flores, 2015 Fuente: Adaptado de Mirzaei *et al* 2008

Fotografía 4. Identificación de conidias de *Botrytis fabae* Vs. Conidias de Mirzaei *et al*

4.2.3 Porcentaje Inhibición del *Botrytis*

Para la variable inhibición, que se determinó mediante el porcentaje de crecimiento del patógeno en las cajas Petri, se determinó lo siguiente:

Cuadro 3. Análisis de varianza para la variable inhibición de *Botrytis fabae*.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	Significancia al 5 %
Bloques	3	2,57	N.S
Tratamientos	3	75,25	*
Error	9	3313,53	
Cv	14,77 %		

Según los resultados obtenidos del análisis de varianza (Cuadro 3) muestra hay diferencias significativas entre los tratamientos propuestos en el experimento al 5%; por otra parte el coeficiente de variación fue de 14,77% lo que nos indica que los datos son confiables.

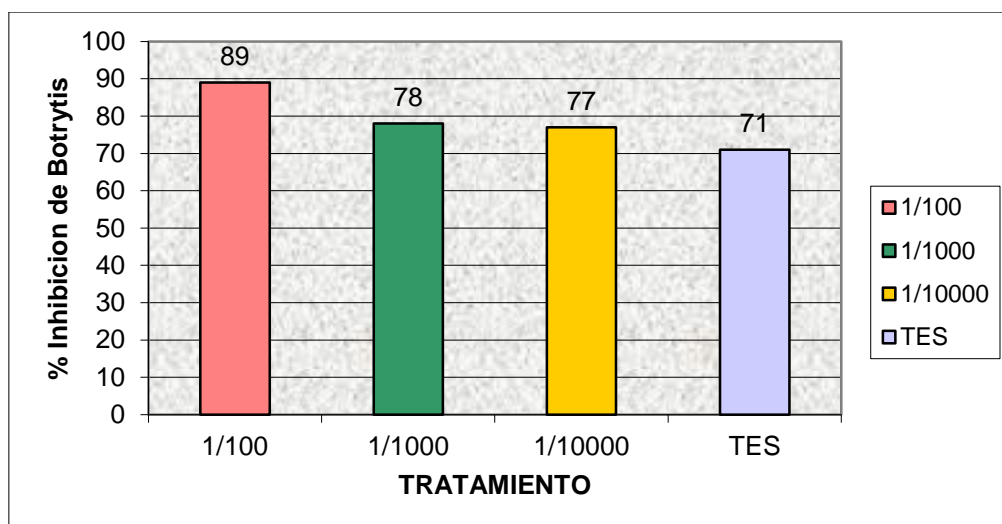


Figura 12. Comportamiento de cada uno los tratamientos en relación a la variable porcentaje de inhibición del hongo.

En la figura 12 muestra que la aplicación de los tratamientos presentan comportamientos similares por lo tanto la inhibición del hongo fue similar frente a la aplicación de las diferentes dosis en relación al testigo, el comportamiento para el caso del tratamiento uno presento un promedio de 89%, para el caso del tratamiento dos presento 78% en promedio y el tratamiento

tres obtuvo un valor de 77% y por último se observó que el testigo cuatro presento un valor de 71%.

Según Fernández (1996), Las saponinas tienen una acción irritante sobre las células. En este sentido, propiciarán la formación de poros sobre la superficie de la célula, produciendo un incremento de su permeabilidad.

Stuardo *et al*, citado por Ahumada 2016. Ensayos con tinción demostraron que la integridad de la membrana fúngica sufrió ruptura. Probablemente se promueve la formación de derivados de saponinas con mayor carácter hidrofóbico, lo cual posibilitaría una mayor afinidad con los esteroides presentes en las membranas celulares y, por lo tanto, una mayor actividad.

El crecimiento del hongo patógeno (*Cercospora beticola*) muestra que los tratamientos con saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) indica una diferencia altamente significativa a partir de las 96 horas de evaluación hasta los 144 horas, esto afirma que el extracto tiene un efecto al crecimiento del hongo in vitro. (Según Apaza R. 2010).

4.2.4 Crecimiento del hongo en cm.

Medición de la dinámica de crecimiento del hongo patógeno (*Botrytis fabae*) frente a las tres dosis del extracto de saponina en su forma sobrenadante in vitro.

Cuadro 4. Análisis de varianza para la variable del crecimiento del patógeno (*Botrytis fabae*).

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	Significancia al 5 %
Bloques	3	1.67	N.S
Tratamientos	3	323.52	*
Error	9	2.74	
Cv	18.39 %		

Fuente: Elaboración Propia N.S. no significativo

*** significativo**

Según los resultados obtenidos del análisis de varianza (Cuadro 3) muestra que hay diferencias significativas entre los tratamientos propuestos en el experimento al 5%; por otra parte el coeficiente de variación fue de 18,39% lo que nos indica que los datos son confiables.

El cuadro anterior nos indica que existe una diferencia significativa entre tratamientos, por lo cual podemos indicar que el crecimiento de *Botrytis* varía estadísticamente según el tratamiento realizado. Para identificar estas diferencias se realizó la prueba de Duncan a un nivel de significancia del 5%, mostrando que el tratamiento uno resultó ser el mejor.

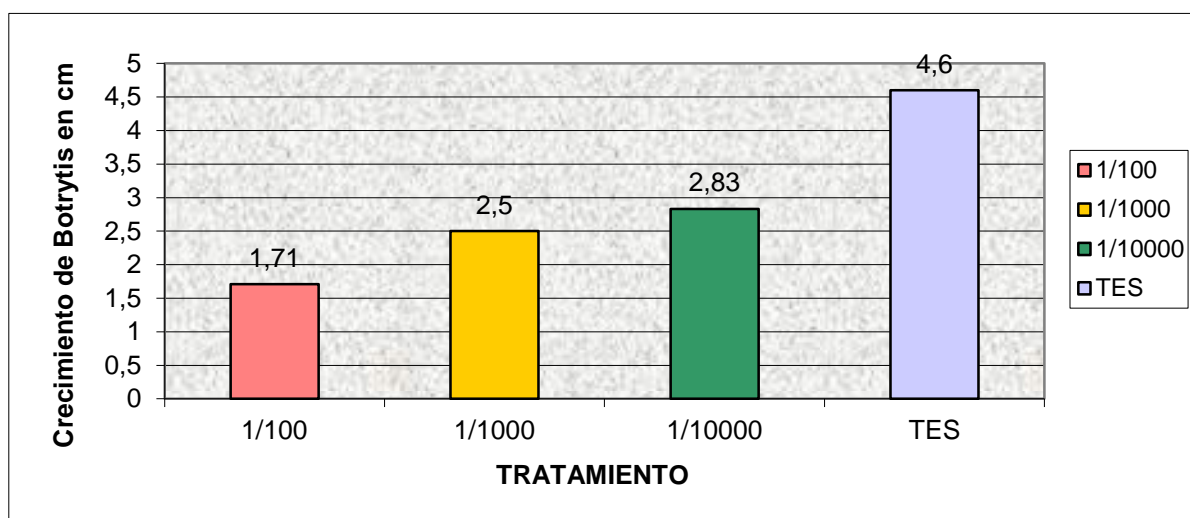


Figura 13. Comportamiento de los tratamientos en relación a la variable crecimiento del hongo en cm.

En la Figura 13 nos muestra la respuesta final de la variable de estudio, crecimiento del hongo (*Botrytis fabae.*) a diferentes dosis de saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en cultivo in vitro con medio PDA, nos muestra que el tratamiento 1/10000 presento un valor de 2,83 cm de inhibición del hongo lo cual nos indica que solo se logró retraer en esa forma de crecimiento del hongo, para el tratamiento 1/1000 se muestra que se desarrolló a 2,5 cm y el tratamiento 1/100 a 1,71 cm siendo este tratamiento el que mejor controlo al patógeno (*Botrytis fabae.*) en relación al testigo con 4,6cm,

Entonces se puede observar que el comportamiento fue ascendente en cuanto la dosis de saponina se va incrementando la inhibición del hongo va mejorando.

Los compuestos de la saponina sobrenadante provocan un debilitamiento de la membrana celular del hongo *Botrytis fabae*; por poseer una acción alelopática, fitoprotectora contra microorganismos y plagas; por tener compuestos fenólicos (Kercetina y Kaenferol) que son compuestos antifúngicos. La membrana es la protección de los hongos y cuando esta membrana se ve afectada el patógeno se allá vulnerable en su desarrollo y división celular por lo que el crecimiento se ve directamente afectado en los polisacáridos y proteínas que forman compuestos necesarios para formar el citoesqueleto o membranas nuclear y/o celular.

Mujica *et al.* (2007), señala asimismo el extracto SN también contiene compuestos fenólicos como kercetina y el kaenferol, tales compuestos tienen una reconocida actividad antifúngica . Forman espumas estables en concentraciones muy bajas, 0,1 %

Stuardo *et al*, citado por Ahumada 2016. Ensayos con tinción demostraron que la integridad de la membrana fúngica sufrió ruptura. Probablemente se promueve la formación de derivados de saponinas con mayor carácter hidrofóbico, lo cual posibilitaría una mayor afinidad con los esteroides presentes en las membranas celulares y, por lo tanto, una mayor actividad.

Según Fernández (1996), las saponinas tienen una acción irritante sobre las células. En este sentido, propiciarán la formación de poros sobre la superficie de la célula, produciendo un incremento de su permeabilidad y estimulando el flujo de otras sustancias y nutrientes.

La aplicación de saponina en material vegetal en dilución 1:10000 tuvo más crecimiento del hongo que las diluciones de mayor concentración a partir de las 48 horas, teniendo significativamente mayor crecimiento del hongo a comparación con las diluciones 1:10 y 1:100 en el tiempo 144 horas (Apaza. 2010).

El mismo autor menciona que el crecimiento del hongo patógeno (*Cercospora beticola*) muestra que los tratamientos con saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) indica una

diferencia altamente significativa a partir de las 96 horas de evaluación hasta los 144 horas, esto afirma que el extracto tiene un efecto al crecimiento del hongo in vitro.

Yanique (2012), indica que los tipos de extracto de saponina de quinua reducen significativamente el crecimiento micelial del hongo *Botrytis sp.* in vitro en medio de cultivo PDA, siendo más eficaz el extracto SN a dosis 1/100, 1/1000, 1/10000 donde se obtuvo menor desarrollo del patógeno, entre estas tres diluciones resalta la dilución 1/10000 lo cual puede deberse al contenido de compuestos fenólicos presentes en el mencionado tipo de extracto, seguido por el extracto Polar y por último el extracto Crudo a los 14 días de su evaluación.

4.3 Resultados tercera fase aplicación de tratamientos en el cultivo en campo

En esta fase, se realizó la siembra del cultivo de haba de acuerdo al diseño experimental para poder observar el comportamiento de la *Botrytis* y las dosis de saponina, para esta etapa se tomaron en cuenta la incidencia de la enfermedad, la Altura de las plantas, Área foliar, Materia verde, Largo de vainas, Peso de vainas y Rendimiento para observar el comportamiento fisiológico de la planta en relación a la incidencia de la enfermedad.

4.3.1 Evaluación de parcelas

Las parcelas fueron evaluadas desde la siembra para poder obtener datos que indicaron la incidencia de la enfermedad.

Para poder afirmar esto se evaluaron los siguientes aspectos:

De acuerdo a los resultados obtenidos y con el objetivo de mostrar el rendimiento en relación a su respuesta del cultivo de haba (*Vicia faba*) y la aplicación de tres dosis de saponina que fueron propuestos.

4.3.2 Temperaturas registradas.

Se obtuvieron las variaciones de temperaturas máximas, medias y mínimas, que se obtuvieron con el uso de un termómetro analógico, realizando un registro diario de las temperaturas durante el estudio.

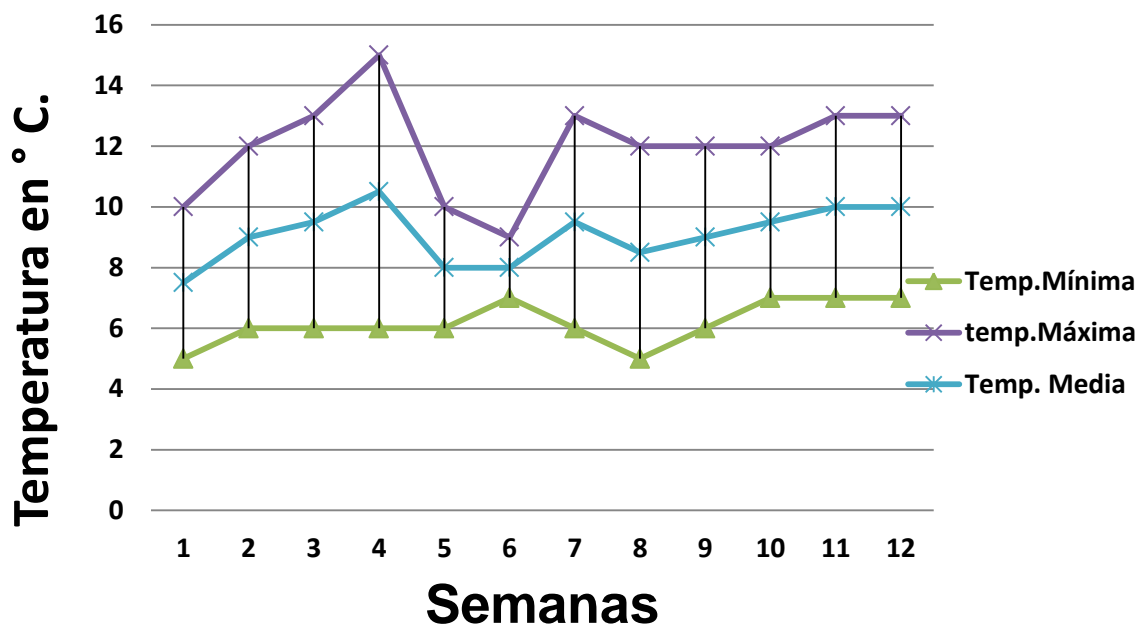


Figura 14. Temperaturas Máximas y Mínimas registradas durante el periodo de estudio.

En la figura 14 podemos observar que durante la investigación, se registró una temperatura promedio de 9,8 °C, con una máxima extrema de 15 °C y una mínima de 5 °C, al respecto Izquierdo (2003) las temperaturas cercanas a los 15 °C son apropiadas para el cultivo.

Este factor es de gran importancia para el crecimiento del hongo, puesto que se logra el mayor porcentaje de germinación de los conidios, cuando la temperatura está entre 15 y 20°C (Rabón, 2001). El micelio es capaz de crecer a temperaturas cercanas a 0°C. Los esclerocios (cuerpos de resistencia) se forman cuando las temperaturas fluctúan entre 11 y 13°C y la esporulación de estos cuerpos es favorecida por temperaturas de 12 a 22°C (Lahlali *et al.*, 2006).

4.3.3 Humedad Relativa

La humedad relativa registrada durante la investigación en campo fue la siguiente:

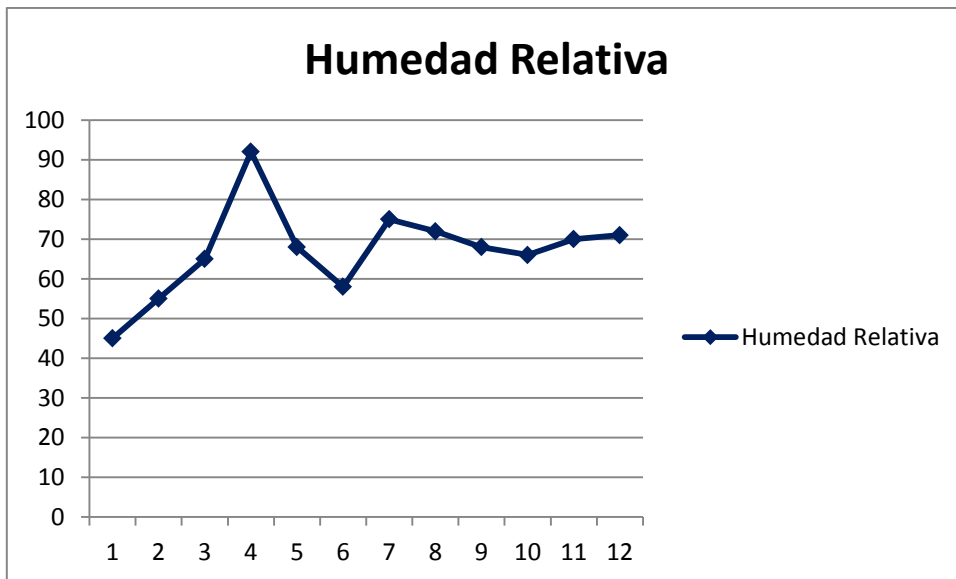


Figura 15. Porcentaje de Humedad Relativa registrada durante el periodo de estudio.

La humedad relativa se considera como el principal factor en el desarrollo del hongo *Botrytis* sp. Necesita de alta humedad relativa, principalmente para la germinación de los conidios ya que la esporulación del hongo comienza entre 70 y 100% de humedad relativa (Eden *et al.*, 1996; Barnes & Shaw, 2002).

El contenido de agua en los tejidos de la planta, al ser mayor, aumenta la permeabilidad celular, facilitando la entrada de diversos patógenos. Por ello la incidencia de *Botrytis* sp. puede incrementarse en épocas de lluvia, en cultivos a libre exposición o por un mal manejo de riego (Rabón, 2001).

4.3.4 Incidencia de *Botrytis* en campo

Para la variable incidencia de *Botrytis*, se evaluó de acuerdo a la comparación con el cuadro de

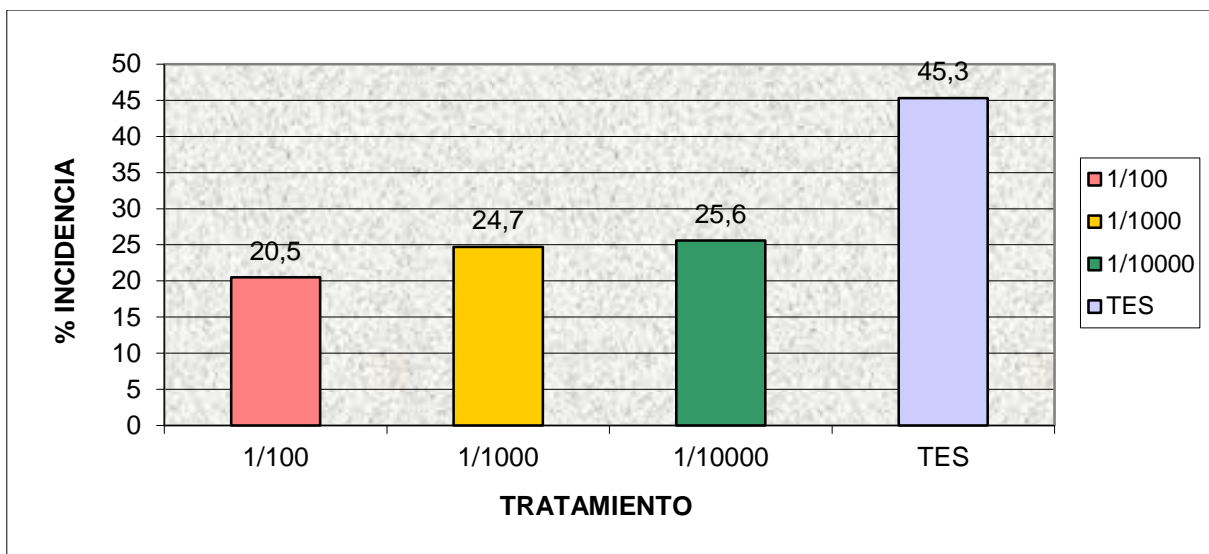
porcentajes de incidencia empleada por Malaguti (1997), expresándola en porcentaje. Comparando las hojas muestras de cultivo de haba (*Vicia faba* L.) con la planilla de Malaguti (1997). Aclarando que la enfermedad se presentó solo en hojas y en algunos tallos.

Cuadro 5. Análisis de incidencia de *Botrytis* .

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	Significancia al 5 %
Bloques	3	1.67	N.S
Tratamientos	3	323.52	*
Error	9	2.74	
Cv	18.39 %		

El cuadro anterior nos indica que existe una diferencia significativa entre tratamientos, por lo cual podemos indicar que la incidencia de *Botrytis* varía estadísticamente según el tratamiento realizado. Para identificar estas diferencias se realizó la prueba de Duncan a un nivel de significancia del 5%, mostrando que el tratamiento con mayor concentración resultó ser el mejor.

Por otra parte se puede observar que se presentó un coeficiente de variación del 18,39 % mostrando un buen nivel de confianza.



Fuente: Elaboración Propia

Figura 16. Incidencia de *Botrytis* por tratamiento.

Como se observa en la figura 16 el tratamiento que menor incidencia de *Botrytis* presentó fue el 1/100 con un 20,5% de incidencia, seguido del tratamiento 1/1000 con una incidencia del 24,7 %, seguido del tratamiento 1/10000 con un 25,6% y por último el testigo con 45,3 % de incidencia de *Botrytis*.

Los compuestos de la saponina sobrenadante provocan un debilitamiento de la membrana celular del hongo *Botrytis fabae*; por poseer una acción alelopática, fitoprotectora contra microorganismos y plagas; por tener compuestos fenólicos (Kercetina y Kaenferol) que son compuestos antifúngicos. La membrana es la protección de los hongos y cuando esta membrana se ve afectada el patógeno se allá vulnerable en su desarrollo y división celular por lo que el crecimiento se ve directamente afectado en los polisacáridos y proteínas que forman compuestos necesarios para formar el citoesqueleto o membranas nuclear y/o celular.

Stuardo *et al*, citado por Ahumada 2016. Ensayos con tinción demostraron que la integridad de la membrana fúngica sufrió ruptura. Probablemente se promueve la formación de derivados

de saponinas con mayor carácter hidrofóbico, lo cual posibilitaría una mayor afinidad con los esteroides presentes en las membranas celulares y, por lo tanto, una mayor actividad.

Según Fernández (1996), las saponinas tienen una acción irritante sobre las células. En este sentido, propiciarán la formación de poros sobre la superficie de la célula, produciendo un incremento de su permeabilidad y estimulando el flujo de otras sustancias y nutrientes.

Las saponinas en el organismo vegetal presentan una amplia gama de propiedades, las cuales incluyen desde emulsionantes, insecticidas, acción alelopática o como fitoprotectores contra ataque de microorganismos y herbívoros Según Osbourn 1996.

Las saponinas han sido intensamente estudiadas en la búsqueda de nuevas alternativas de control de enfermedades. Las de tipo monodesmisídicas presentan una alta actividad fungicida Según Osbourn, 1996; Hostettmann y Marston, 1995, (ambos citados Apaza R. 2010).

Asimismo el extracto SN también contiene compuestos fenólicos como kercetina y el kaenferol, tales compuestos tienen una reconocida actividad antifúngica casi al igual que las saponinas la actividad pueda deberse a un efecto sinérgico entre ambos grupos de saponinas y compuestos fenólicos, los cuales brindaron mejores resultados, a diferencia de los tipos de extracto Polar y Crudo los cuales no presentan compuestos fenólicos (Entrevista: Lozano, M. 2015. Características de saponinas. La Paz Bolivia).

La aplicación de saponina en material vegetal. La dilución 1:10000 tuvo más crecimiento del hongo que las diluciones de mayor concentración a partir de las 48 horas, teniendo significativamente mayor crecimiento del hongo a comparación con las diluciones 1:10 y 1:100 en el tiempo 144 horas (citado Apaza R. 2010).

Coca (2007), señala que la mancha de chocolate es una enfermedad que afecta al cultivo del haba desde la emergencia y afecta hojas, tallos, flores, vainas verdes y granos. Es una enfermedad destructiva de las zonas de altura. El color chocolate sobre las hojas, son el

síntoma característico y corresponde a la fase no agresiva del patógeno. El abundante crecimiento vegetativo, alta humedad ambiental hacen más vulnerables para el desarrollo de la enfermedad.

El mismo autor señala que con el mejoramiento de las condiciones ambientales (enero - marzo) más favorables para el desarrollo de la enfermedad, estas manchas alcanzan a los tallos, flores y vainas, convirtiéndose en verdaderos tizones foliares de color chocolate.

4.3.5 Altura de la planta (cm)

Esta evaluación de la altura de las plantas fue hecha con una huincha métrica para determinar el crecimiento y vigor de las plantas. Se tomó datos a los 90 días después de la germinación, como se detallan a continuación:

Cuadro 6. Análisis de Varianza para altura de planta.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	Significancia al 5 %
Bloques	2	2061.9	N.S.
Tratamientos	1	3037,1	N.S.
Error	20	25,5	
CV		14.77 %	

Como observamos en el cuadro N° 5 no existió diferencia significativa entre bloques, realizando la prueba de Duncan, tampoco existieron diferencias significativas entre tratamientos puesto que tienen la misma letra, por otra parte el Coeficiente de Variación fue de 14,77 % los que indica que los datos son confiables.

La presencia de diferencias no significativas para ambos casos fue posiblemente a causa de que las aplicaciones planteadas, no causaron ningún efecto sobre la altura de la planta, como

también se puede observar que los factores ambientales no influyeron en esta variable altura de planta.

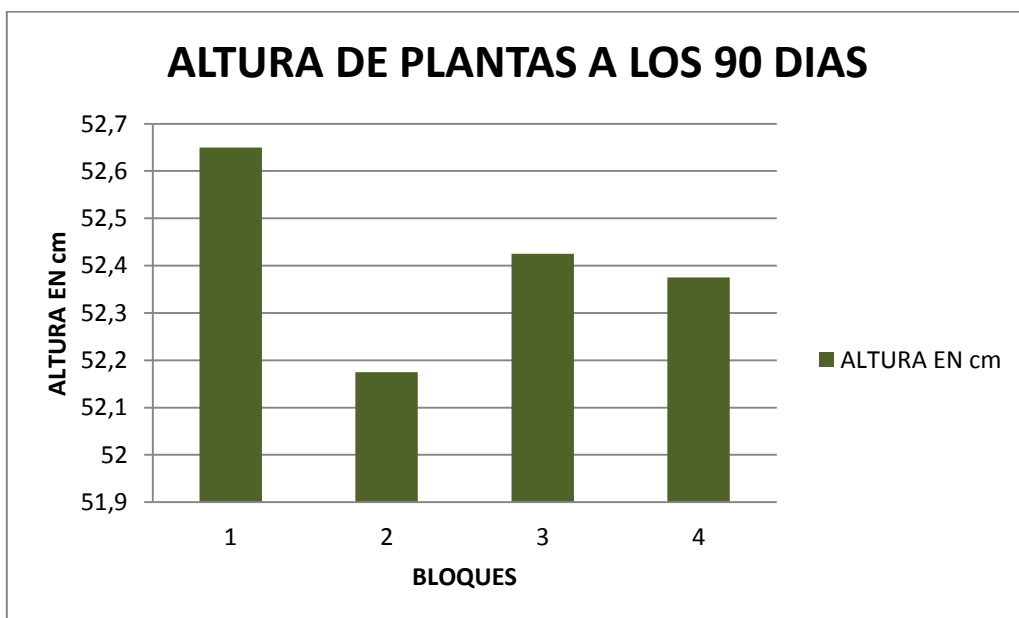


Figura 17. Comportamiento de los bloques en relación a la variable altura de plantas a los 90 días.

Coca (2007), en el estudio realizado en la producción de haba (dosis) se obtuvo un rendimiento en altura de 17,7 cm en 15 días, estos resultados son aparentemente similares a los que se obtuvo en el presente estudio con 52,65 cm a los 90 días de altura promedio.

Ralde (2000), en un estudio realizado en la producción de haba, con las formas de aplicación, obtuvo una altura de planta de 18,8 cm en 15 días, estos resultados son casi similares a los que se obtuvo en el presente estudio con 52 cm de altura promedio a los 90 días.

Según Coca (2007), mencionado por Castilla (2005), indica que el movimiento del aire afecta al crecimiento de las plantas al afectar a las transferencias de energía, a la transpiración y a la absorción de CO₂, de modo que hay una influencia en el tamaño de la hoja, el crecimiento del tallo y en la producción.

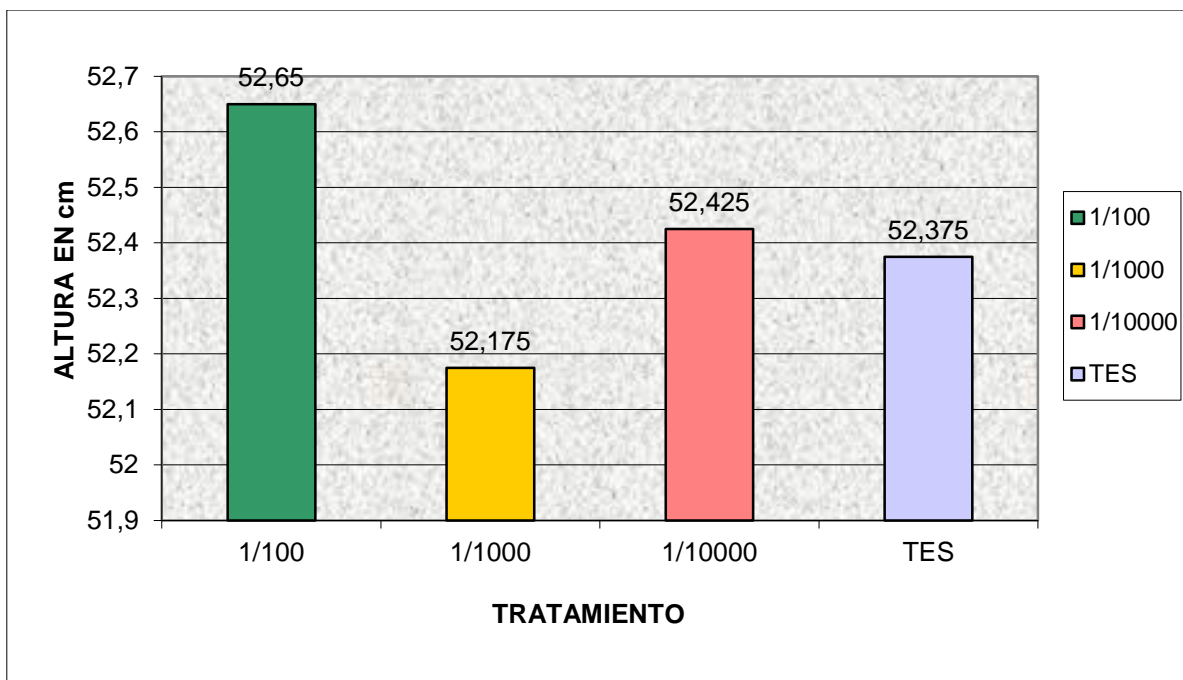


Figura 18. Comportamiento de los tratamientos en relación a la altura de la planta a los 90 días.

Según la prueba de Duncan al 5 % de probabilidad no existen diferencias entre tratamientos por lo que se concluye que la saponina no inciden sobre la altura de la planta.

4.3.6 Área foliar (cm²)

El área foliar se evaluó midiendo el ancho y largo de las hojas muestra, 9 hojas por planta por tratamiento, sacando promedios y se usó la fórmula para área foliar y se obtuvo el área en cm².

$$AF = A \times L \times 0,75$$

Cuadro 6. Análisis de Varianza para área foliar.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	Significancia al 5 %
Tratamientos	1	3476,3	*
Bloques	2	1395,5	N.S.
Error	20	8,6	
CV		14.66 %	

Según los resultados obtenidos del análisis de varianza (Cuadro 6), se muestra que existen diferencias significativas para el caso de Tratamiento, esto debido a que los factores externos en el lugar de estudio llegaron a influir sobre este factor reflejando esto en el limbo de la hoja y la barrera fitoprotectora y de fertilización por dosis de saponina. Además que se debe relacionar la incidencia por tratamiento da como resultado que el área foliar este mas sana en los tres primeros tratamientos a diferencia del testigo, por lo que la planta tuvo mejor opción de asimilar CO², H₂O y Luz, para transformar en biomasa.

La utilización de saponina como fertilizante de suelo como menciona Página Siete, (2013), sería una explicación para la diferencia. “Cuando obtenemos la cascarilla inmediatamente la volvemos a utilizar como fertilizante de la tierra en la que se volverá a cultivar el grano de oro. Ello porque refuerza los valores nutritivos de la tierra y en realidad nos falta saponina”, explica Choque.

Para el caso del Bloques no llegaron a presentar diferencias significativas, esto se debió posiblemente a que el terreno era homogéneo, por otra parte el coeficiente de Variación fue de 14,66 % los que indica que los datos son confiables.

También Galván (1994), menciona que como sucede en todos los vegetales, el ritmo de crecimiento al estar regulado por acciones metabólicas y a su vez ellas catalizadas por diferentes enzimas, la temperatura juega un rol fundamental en determinar la velocidad, la tasa de incremento de materia fresca o seco.

Cubero (1992), indica que al incorporar fertilización, se incrementa la CIC lo cual es favorable para la planta por que estimula la absorción de nutrientes intercambiando de esta forma el crecimiento y desarrollo de la planta.

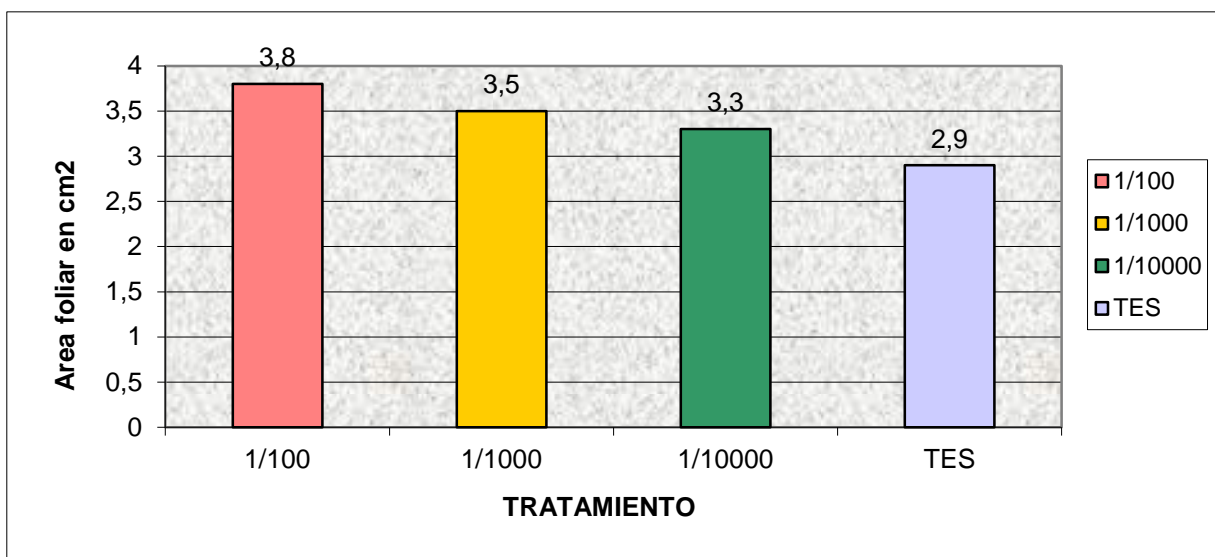


Figura 19. Comportamiento de los tratamiento para el área foliar en cm²

En la figura 19, se observa la prueba de Duncan al 5% para la variable Tratamiento o Dosis, la cual muestra diferencias significativas entre las aplicaciones con saponina 3,8cm² para el mejor tratamiento y el Testigo 2,9 cm² respectivamente.

Cubero (1992), menciona que el crecimiento de las diferentes partes de la planta se suele determinar por la altura, el área foliar o el peso seco, en relación con el tiempo transcurrido durante el ciclo de vida. La diferenciación es el proceso mediante el cual se forman y reproducen clases de células.

El mismo autor mención; una vez que han aparecido las raicillas y las primeras hojas, la planta está capacitada para obtener los nutrientes del medio externo y demás elementos para fabricar su propio alimento (fotosíntesis), motivo por el cual se debe exponer a condiciones óptimas de luminosidad, oxigenación y nutrición.

La utilización de saponina como fertilizante de suelo como menciona Página Siete, (2013), sería una explicación para la diferencia. “Cuando obtenemos la cascarilla inmediatamente la volvemos a utilizar como fertilizante de la tierra en la que se volverá a cultivar el grano de oro. Ello porque refuerza los valores nutritivos de la tierra y en realidad nos falta saponina”, explica Choque.

4.3.7 Materia verde (Kg/m²)

Para la variable Materia verde se pesaron con romana las plantas al momento de la cosecha para obtener el peso total de biomasa obtenida por tratamiento. De esta forma ver si la saponina pudo influir en el desarrollo de cultivo de haba (*Vicia faba*).

Cuadro 8. Análisis de varianza para biomasa total.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	Significancia al 5 %
Tratamientos	1	191,0	*
Bloques	2	115,7	N.S.
Error	20	2,7	
CV		7,07 %	

En el cuadro 8, de análisis de varianza podemos observar que para el caso de Bloques no existen diferencias significativas lo que posiblemente paso por que al ser las plantas con características similares tuvieron un desarrollo similar uno con respecto al otro, pero si podemos observar que para el caso del Tratamiento si presentan diferencias significativas, lo que se podría explicar que las aplicaciones tuvieron un diferente comportamiento proporcionando estas diferentes maneras de controlar el avance de la enfermedad lo que produjo diferente comportamiento en el cultivo.

Para poder dosificar un Fungicida es necesario conocer la formulación y concentración del ingrediente activo (i.a.), después de esto se procede a hacer los cálculos siguiendo cualquiera de los dos métodos; el de la regla de tres o fórmula (Pérez *et. al.*, 2010). Según Porco (2009), para ciertas dosis recomendada en cc/ha, ml/ha o g/ha se toma en cuenta una hectárea utilizándose en plantas de 20 cm 200 L de agua, de 30 cm 300 L, de 40 cm 400 L, de 40 a 60 cm 400 L y en pleno follaje hasta un máximo de 600 litros de agua por hectárea (Huici, 2004).

La aplicación del Manejo y Control Integrado de Plagas y Enfermedades en los campos de cultivo de haba, supone una actitud abierta y flexible para responder a cada tipo de plaga o enfermedad según el caso. No existen recetas o fórmulas que puedan generalizarse a cualquier plaga o cultivo.

La utilización de saponina como fertilizante de suelo como menciona Página Siete, (2013), sería una explicación para la diferencia. “Cuando obtenemos la cascarilla inmediatamente la volvemos a utilizar como fertilizante de la tierra en la que se volverá a cultivar el grano de oro. Ello porque refuerza los valores nutritivos de la tierra y en realidad nos falta saponina”, explica Choque.

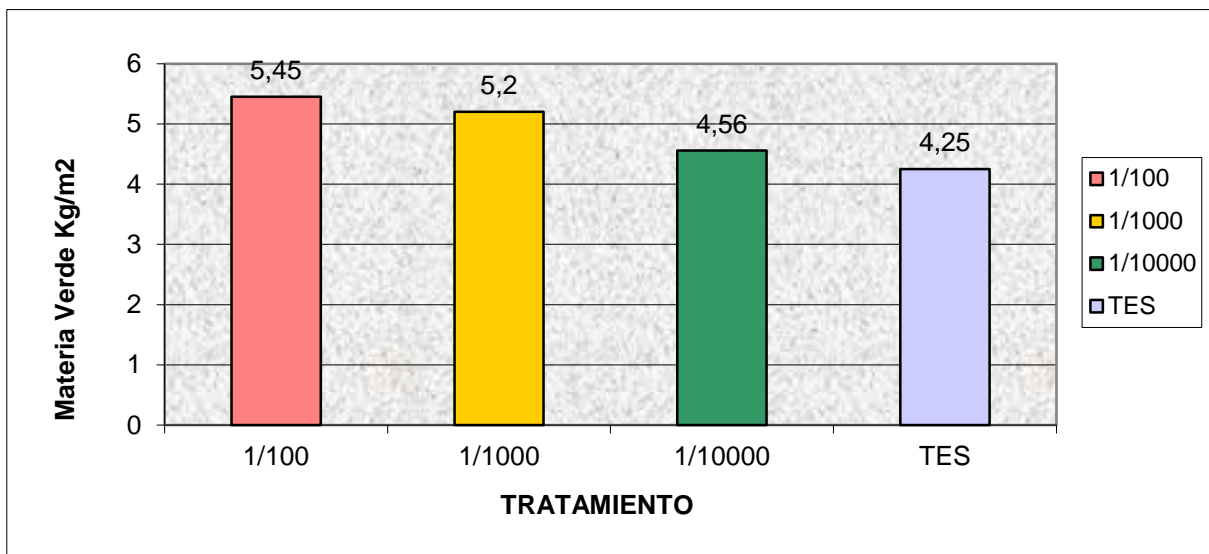


Figura 20. Comportamiento de los tratamientos para materia verde en Kg/m²

En la figura 20, se muestra la comparación Duncan realizada para el factor tratamiento, muestra que hubo una diferencia aplicando saponina al cultivo de 5,45 Kg/m² para el mejor tratamiento por encima del testigo que presento un valor promedio de 4,25 Kg/m².

Ñíguez (1988), menciona que se ha documentado que períodos de tiempo de 7 a 10 días son más que suficientes para completar el ciclo de haba. Ciclos más largos no serían convenientes debido a la disminución de materia seca y de calidad en general.

Cubero (1992), menciona que en una planta el crecimiento y la diferenciación transcurren paralelamente y por ello, parecería tratarse de un solo proceso que llamamos desarrollo. Una vez que han aparecido las raicillas y las primeras hojas, la planta está capacitada para obtener los nutrientes del medio externo y demás elementos para fabricar su propio alimento (fotosíntesis), motivo por el cual se debe exponer a condiciones óptimas de luminosidad, oxigenación y nutrición

Página Siete, (2013), “Cuando obtenemos la cascarilla inmediatamente la volvemos a utilizar como fertilizante de la tierra en la que se volverá a cultivar el grano de oro. Ello porque refuerza los valores nutritivos de la tierra”, explica Choque.

Las saponinas actúan como barreras protectoras contra el ataque de patógenos y herbívoros, por lo que se justifica que las partes más vulnerables de la planta tales como hojas, tallos, frutos y raíces, sean los reservorios de este tipo de compuestos, Lozano (2015).

4.3.8 Largo de vainas (cm).

Para el largo de vaina se realizó la medición con una regla tomando desde la base de la vaina hasta la punta.

Cuadro 9. Análisis de Varianza para largo de vaina.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	Significancia al 5 %
Tratamientos	1	835,8	*
Bloques	2	432,7	N.S.
Error	20	8,5	
CV		14,77 %	

En el cuadro 9, de análisis de varianza podemos observar que no se presentan diferencias significativas para el caso de Bloques esto se debe posiblemente al terreno homogéneo, en cuanto el factor tratamiento si presento diferencias, probablemente porque al aplicar saponina en diferentes dosis inciden sobre el cultivo en el desarrollo probablemente por la fertilización que provoca y sobre todo el control de la enfermedad.

También se observa que presenta un coeficiente de variación de 14,77% lo cual muestra la confianza del estudio.

Cuando no se maneja bien los niveles de fertilización de nutrientes en el suelo, el cultivo no tendrá buen crecimiento y desarrollo, la planta se debilita, las vainas son pequeñas y como consecuencia baja la producción. (Yáñez, 2013)

Así mismo menciona El manejo y control integrado de plagas consiste en combinar distintos tipos de controles tanto preventivos como el mantenimiento de niveles de tolerancia, de manera que exista un equilibrio entre insectos plaga y benéficos y aplicación de bioinsecticidas e insecticidas de baja toxicidad.

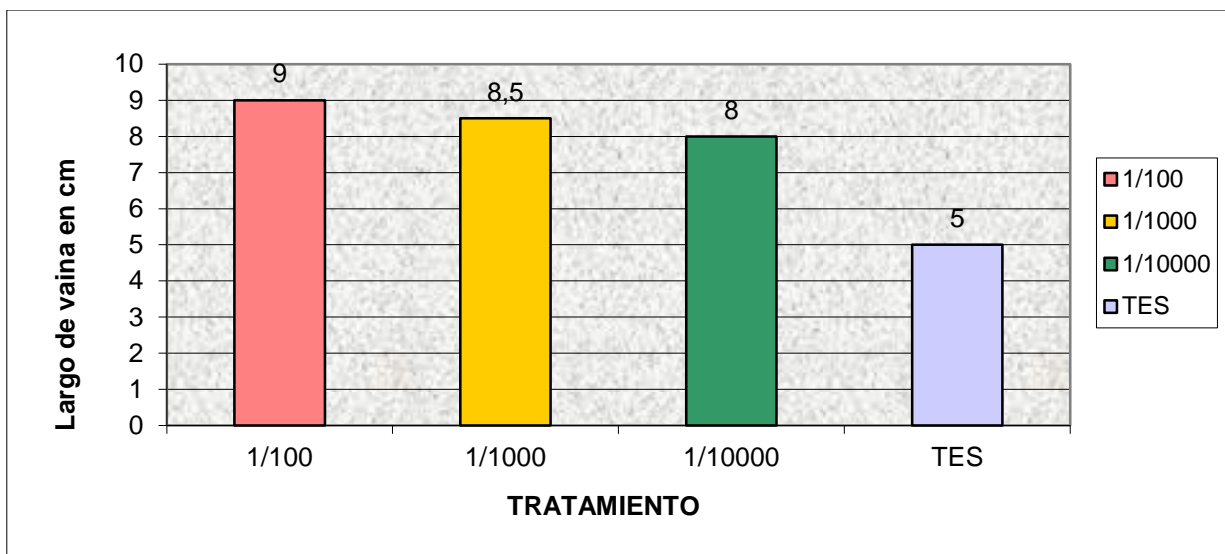


Figura 21. Comportamiento de los tratamientos para el largo de vaina en cm

En la figura 21 se observa que la aplicación realizada en la parte aérea de la planta presento mejor resultado en cuanto al largo de la vaina lo cual nos indica que si aplicamos foliarmente nos da mejores resultados en cuanto al control de esta enfermedad y muestra mejor calidad de vaina.

Minches (s/f), menciona que el uso de plaguicidas, en especial el de fungicidas para el control de enfermedades en los cultivos, como lo es el cultivo de haba (*Vicia faba* L.), el cual se ve seriamente dañado por las enfermedades, la de mayor importancia es la causada por el hongo *Botrytis fabae*, comúnmente llamada mancha de chocolate, este hongo ataca tallos, hojas, vainas y flores, disminuyendo la producción hasta en un 60%, por lo que los productores se ven en la necesidad de realizar aplicaciones cada 15 días en las etapas críticas del cultivo.

Las saponinas actúan como barreras protectoras contra el ataque de patógenos y herbívoros, por lo que se justifica que las partes más vulnerables de la planta tales como hojas, tallos, frutos y raíces, sean los reservorios de este tipo de compuestos, Lozano (2015).

En los cultivares de variedad mayor, que producen semillas más grandes o "habones" las vainas son de menor longitud, alcanzando valores promedio iguales o inferiores a 15 cm (Tapia, 1993)

4.3.9 Peso de vaina (Kg)

Con una balanza se pesaron las vainas después de su cosecha, por cada tratamiento para comparar el rendimiento de cada unidad experimental. Obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 10. Análisis de Varianza para la variable peso de vaina.

Fuente de variación	G.L.	Cuadrado Medio	Significancia al 5 %
Tratamientos	1	1160,6	*
Bloques	2	592,2	N.S.
Error	20	8,5	
CV		14,77 %	

En el cuadro 10 se puede observar que no llegaron a presentar diferencias significativas entre bloques. Pero por otra se puede observar que las aplicaciones realizadas si llegaron a presentar diferencias significativas sobre la variable peso de vaina, esto probablemente que al ser aplicado los tratamientos en la parte aérea de la planta llego a controlar mejor el patógeno y se tubo mejores resultados entre los tratamientos y aplicaciones en tempranas horas de la mañana.

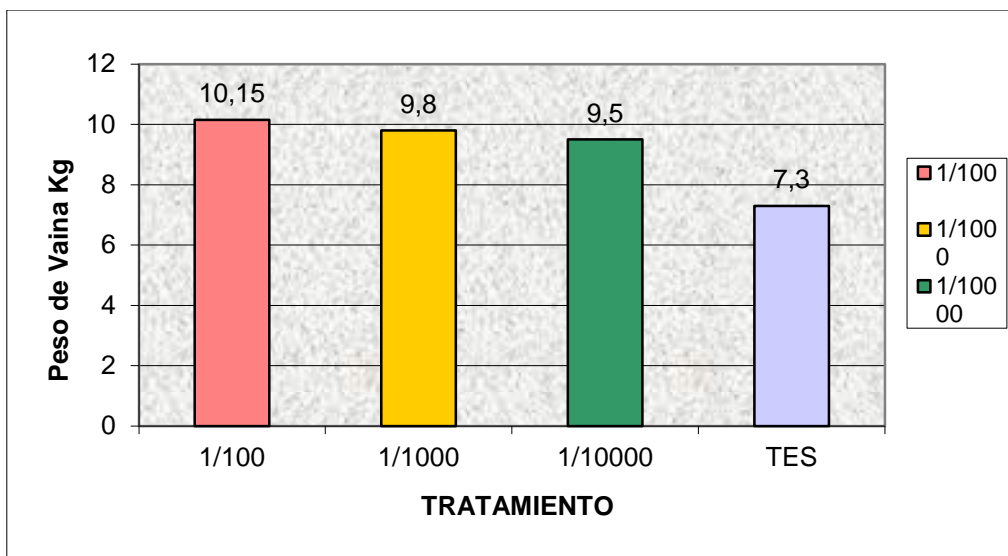


Figura 22. Comportamiento de los tratamientos para el peso de vaina en Kg

En la figura 22 se observa que existe una diferencia entre los tratamientos donde podemos observar que la aplicación foliar llegó a presentar un valor promedio de 10,15 Kg del mejor tratamiento en relación con el testigo que presentó un valor de 7,3 Kg.

La saponina tuvo una acción alelopática, fitoprotectora contra microorganismos y plagas por tener compuestos fenólicos (Kercetina y Kaenferol) que son antifúngicos y afectan la reproducción celular de patógenos, que no se presentaron en las vainas.

Las saponinas actúan como barreras protectoras contra el ataque de patógenos y herbívoros, por lo que se justifica que las partes más vulnerables de la planta tales como hojas, tallos, frutos y raíces, sean los reservorios de este tipo de compuestos, Lozano (2015).

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye:

- El agente causal de la Mancha de Chocolate en el cultivo de haba (*Vicia faba* L.) en el municipio de Chicani fue *Botrytis fabae*.
- En laboratorio se demostró que la saponina sobrenadante inhibe y reduce el crecimiento de *Botrytis fabae*. sobre todo la aplicación 1/100.
- Se concluye que los resultados de las variables evaluadas en el cultivo: área foliar, materia verde, largo de vaina y peso de vaina; fueron mejores en aquellas plantas que fueron tratadas con aplicaciones de saponina en tres dosis propuestas, en especial la dosis 1/100 que alcanzo rendimientos positivos en relación al testigo.
- Las anteriores conclusiones muestran que la aplicación de saponina sobrenadante en tres diferentes dosis y en especial la dosis 1/100 controla la enfermedad mancha de chocolate causada por el patógeno *Botrytis fabae*.
- Por último se concluye que en campo también es efectiva la aplicación de saponina sobrenadante para controlar la incidencia de *Botrytis fabae*; actuando también como fitoprotector y de resistencia para lograr plantas sanas y con buenos rendimientos. Como en todas las variables la dosis 1/100 fue la que mostro mejores resultados.

6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a lo estudiado se puede recomendar lo siguiente:

- Realizar aplicaciones de extractos de saponina aplicados en diferentes ciclos de crecimiento del cultivo de haba para poder observar si existe mayor control de la enfermedad estudiada.
- Así mismo se recomienda realizar estudios donde se aplique el extracto de saponina en diferentes etapas de ataque del hongo.
- Recomendar la aplicación nocturna en comparación con la aplicación diurna.
- En investigaciones posteriores es necesario realizar una inoculación previa al campo con el patógeno en estudio, para poder obtener resultados más precisos en cuanto a control.
- Realizar investigaciones para determinar la cantidad de preparación a aplicar en campo, para lograr un buen control y eficiente.

7. BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, g. n. 1997. Fitopatología. ed. Limusa. México D.F., México

AHUMADA, A 2016. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. Artículo Científico. Popoyan , Colombia.

APAZA DIVAPURI, R. 2010. Determinación de la dosis óptima de saponina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) para el control del hongo *Cercospora beticola* en el cultivo de acelga (*beta vulgaris* l.) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de grado. Carmen Pampa, UAC-CP Carmen Pampa. 41-46 p.

Alvarez, T; Pelaez, D. 2001. Manual de Micología Experimental. Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas. UMSA. La Paz. Bolivia.

Barnett, y col. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgenes Publishing Company. USA.

JESÚS AGUIRRE SANCHEZ, 2012, evaluación de plagas y enfermedades del haba bajo diferentes tipos de manejo.

DAYSI CECIBEL ATACUSHI ROSERO, 2015 “efecto de las distancias de siembra en tres variedades del cultivo de haba (*vicia faba*), bajo un sistema de agricultura limpia”.

CASTAÑÓN TOVAR JULIO. 2008, Evaluación de la capacidad antagonista in vitro de aislamientos de *trichoderma spp* frente al hongo fitopatógeno. Pontificia universidad javeriana. Facultad de ciencias.

COCA - MORANTE, M. 2007. Manchas foliares del haba (*Vicia faba* l.). Facultad de ciencias agrícolas, pecuarias, forestales y veterinarias dr. “Martín cárdenas”. Universidad mayor de san simón. Cochabamba, Bolivia. 4pp

CUBERO, jl. 1992. variedades tradicionales de leguminosas de grano para alimentación humana (en línea). Consultado 20 de jun 2014. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/cap5-3.htm#92>.

CUMANDA SANTANA MAYORGA, 2014. “evaluación de métodos de extracción y dosis de aplicación de cola de caballo (*Equisetum arvense*) para el control ecológico de roya (*Puccinia sp.*) en el cultivo de cebolla blanca (*Allium fistulosum*)”

J. L. FONTAN-CANDELA, (s/f), instituto español de fisiología y bioquímica. c. u. Madrid, las saponinas y la botánica. p 65-67.

FERNANDEZ, VALVERDE MARISELA, 1996. Selección de mutantes de *Chenopodium quinoa* willd en la generación y cuantificación de saponina en las variedades isluga y barandales adaptados al valle de Toluca. p. 32 – 35.

GALLARDO, g. 1997. Producción de forraje hidropónico de cebada en ambiente controlado con tres soluciones nutritivas en dos concentrados. Tesis, la paz. Universidad mayor de San Andrés. 48p.

DOUSSOULIN JARA HERMAN ALBERTO, 2010 evaluación fitopatológica en cultivares de haba (*vicia faba* l.) de crecimiento determinado, en Valdivia, región de los ríos 29-35.

HUICI, O. 2005. Manejo sostenible del cultivo de tomate.

MANGASS SUSANA ALONZO, 2009 departamento de productos vegetales biología vegetal. Producción de saponinas triterpénicas en cultivo in vitro de centella asiática
Recomendaciones hidropónicas con diferentes densidades de siembra y frecuencias de riegotécnicas. La Paz. Bolivia. P5-7

INIAF, instituto nacional de innovación agropecuaria y forestal manual del cultivo de haba, 2000 en línea, consultado el 20 de febrero de 2017. Disponible en:
<http://www.amdeco.org.bo/archivos/manualdelcultivodelhaba.pdf>

RALDE v. 2000. Producción de avena forrajera (*avena sativa*) en cultivo

SÁNCHEZ, m. 2001. Características y control químico de plagas y enfermedades del cultivar ají (*capsicum pendulum* l.) huaracateño rojo. Tesis Lic. ing. agr. Sucre. Bolivia. u.m.r.p.s.f.x.ch.51 p.

SILVA, industrial unido, 1997 en línea, disponible en:
<http://www.monografias.com/trabajos42/follaje-materia-prima/follaje-materia-prima.shtml#ixzz4armlpijn>

LOPEZ R; MURILLO B; RODRIGUEZ g, 2009. El forraje verde hidropónico (fvh): una alternativa de producción de alimento para el ganado en zonas áridas. Interciencia. Vol. 34, no. 2.

MANUAL TÉCNICO MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS, 2001. Proyecto regional de fortalecimiento de la vigilancia fitosanitaria en cultivos de exportación no tradicional.

MINCHEZ GÓMEZ IZAÍAS JOSUÉ, (s/ f). Evaluación de trichoderma harzianum para el control de botrytis fabae en el cultivo de haba; San Marcos. Universidad Rafael Landívar.

MASCARO, l 1994. Diccionario médico. 3 ed. Barcelona, rosario. p. 323.

MUJICA SÁNCHEZ, a. 2007. Conservación de la agrobiodiversidad de granos andinos quinua (*chenopodium quinoa* willd.), kañawa (*chenopodium pallidicaule* allen), milmi (*amaranthus caudatus* l.) y tauri (*lupinus mutabilis* sweet.) y sus parientes silvestres en los andes. Congreso sudamericano de ingenieros agrónomos de Bolivia (la paz, 10-12 oct. 2007).

MUJICA; JACOBSEN, 1999. Origen y descripción de la quinua (en línea). Consultado 28 de jun. 2014. disponible en: <http://www.buenastareas.com/ensayos/saponina-de-quinua/1565556.html>

TENORIO, R; TERRAZAS, 2010 concentrados de saponina de *Chenopodium quinoa* y de *Caiphora andina*: alternativas como biocontroladores de hongos fitopatógenos. “instituto de investigaciones fármaco-bioquímicas; instituto de investigaciones en productos naturales, Universidad Mayor de San Andrés-UMSA.”

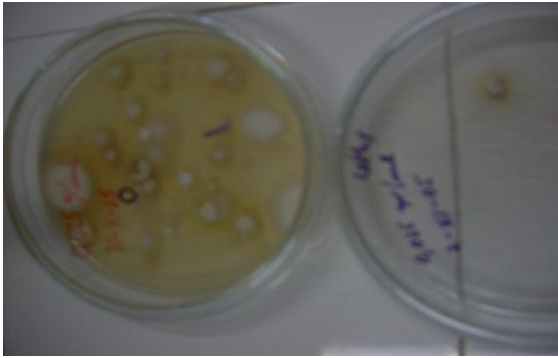
Página siete, 2013 saponina, un tesoro desconocido de la cascara de quinua.

YÁNEZ GABRIEL f. 2013. Evaluación del deshierbe y distancias de siembra en el cultivo de haba. Amoro ecuador.

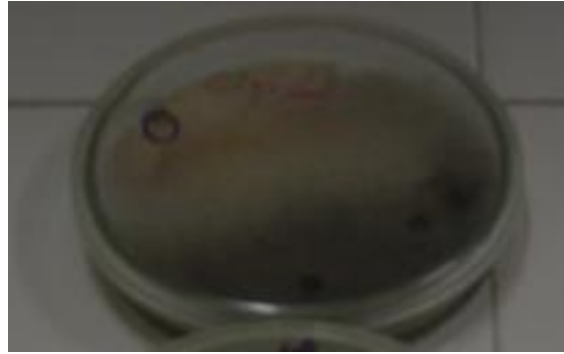
YANIQUE SARZURI, C. 2012 Efecto de diferentes dosis y extractos de saponina de quinua (*Chenopodium quinoa*) en su forma cruda, polar y sobrenadante para el control biológico del hongo *Botrytis* sp. en el cultivo del haba (*Vicia faba*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis de grado. Carmen Pampa, UAC-CP Carmen Pampa. 40pg.

8. ANEXOS

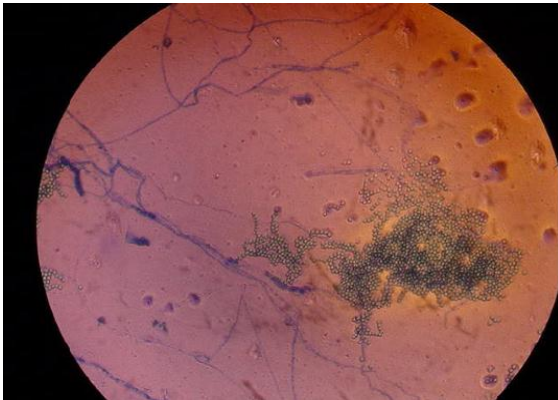
ANEXO 1. Imágenes de la investigación fase laboratorio



Etapa de aislamiento del patógeno



Botrytis sp. aislado



Mucor aislado



Penicillium (Identificación macroscópica)



Conservación de *Botrytis* en punta de hifa

ANEXO 2. Mediciones diarias del patógeno en cultivo *In vitro*

Curva de crecimiento *Botrytis fabae*

Primer día

	R1	R2	R3	PROM
TRAT. 1	5,2	5,2	5,2	5,2
TRAT. 2	5,4	5,4	5,3	5,4
TRAT. 3	5,6	5,4	5,6	5,5
To	6	6	6	6

Segundo día

	R1	R2	R3	PROM
TRAT. 1	7,5	7,6	7,7	7,6
TRAT. 2	8,3	8,2	8,5	8,3
TRAT. 3	9,6	9,5	9,7	9,6
To	10,4	10,7	10,5	10,5

Tercer día

	R1	R2	R3	PROM
TRAT. 1	9,6	9,5	9,6	9,6
TRAT. 2	12,2	12,3	12,3	12,3
TRAT. 3	15,6	15,7	15,7	15,7
To	21,7	21,6	21,7	21,7

Cuatro día

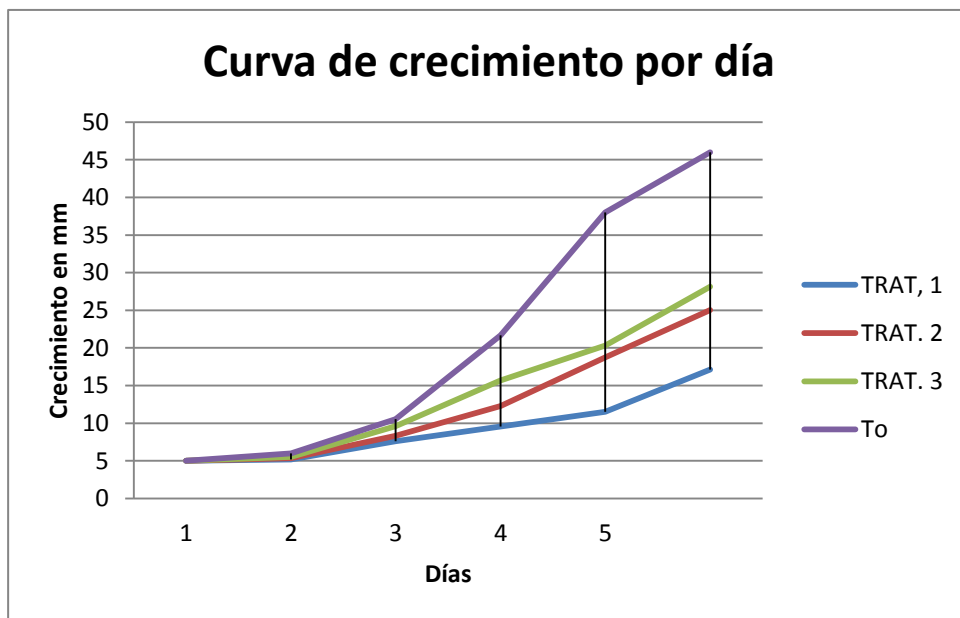
	R1	R2	R3	PROM
TRAT. 1	11,4	11,6	11,5	11,5
TRAT. 2	18,7	18,9	18,6	18,7
TRAT. 3	20,3	20,2	20,4	20,3
To	38,2	37,9	37,9	38

Quinto día

	R1	R2	R3	PROM
TRAT. 1	17,2	17,1	17,1	17,1
TRAT. 2	25	25,1	25	25
TRAT. 3	28,2	28,1	28,1	28,1
To	46	46	46	46

DIA

TRAT.	0	1	2	3	4	5
TRAT. 1	5	5,2	7,6	9,6	11,5	17,1
TRAT. 2	5	5,4	8,3	12,3	18,7	25
TRAT. 3	5	5,5	9,6	15,7	20,3	28,1
To	5	6	10,5	21,7	38	46



Curva de Inhibición de *Botrytis*

Primer día

	R1	R2	R3	PROM
TRAT, 1	20	21	22	21
TRAT. 2	17	18	17	17,3
TRAT. 3	13	12	13	12,7
To	9	8	9	8,7

Segundo día

	R1	R2	R3	PROM
TRAT, 1	63	62	63	63
TRAT. 2	54	55	54	54,3
TRAT. 3	47	45	46	46,0
To	34	35	34	34,3

Tercer día

	R1	R2	R3	PROM
TRAT. 1	75	75	74	75
TRAT. 2	67	66	65	66
TRAT. 3	64	65	64	64,3
To	58	59	57	58

Cuatro día

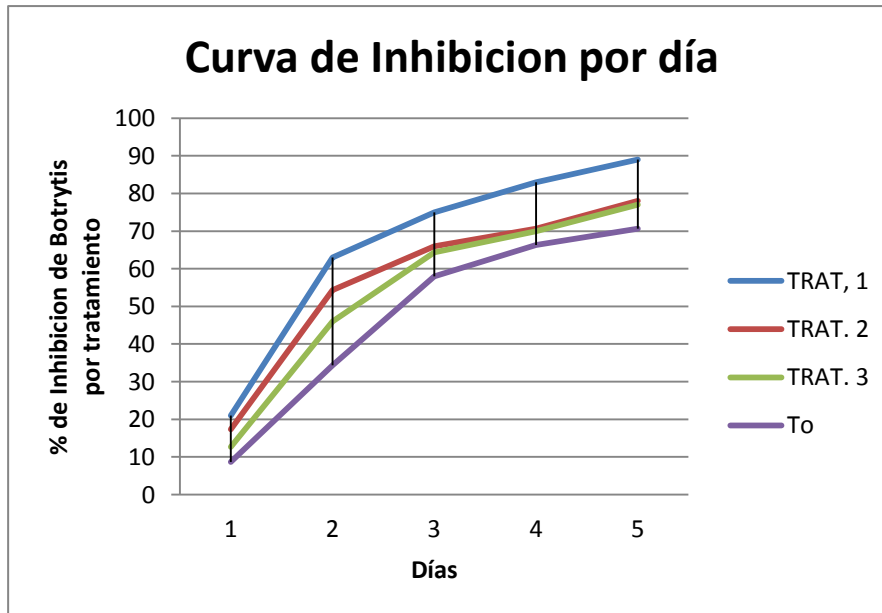
	R1	R2	R3	PROM
TRAT, 1	83	84	83	83
TRAT. 2	71	71	70	71
TRAT. 3	70	70	70	70
To	66	66,0	67	66

Quinto día

	R1	R2	R3	PROM
TRAT. 1	88	89	89	89
TRAT. 2	77	78	78	78
TRAT. 3	76	77	77	77
To	70	71	71	71

DIA

TRAT.	1	2	3	4	5
TRAT, 1	21	63,0	75,0	83	89
TRAT. 2	17,3	54,3	66,0	70,7	78
TRAT. 3	12,7	46,0	64,3	70,0	77,0
To	8,7	34,3	58,0	66	71



ANEXO 3. Imágenes fase de campo

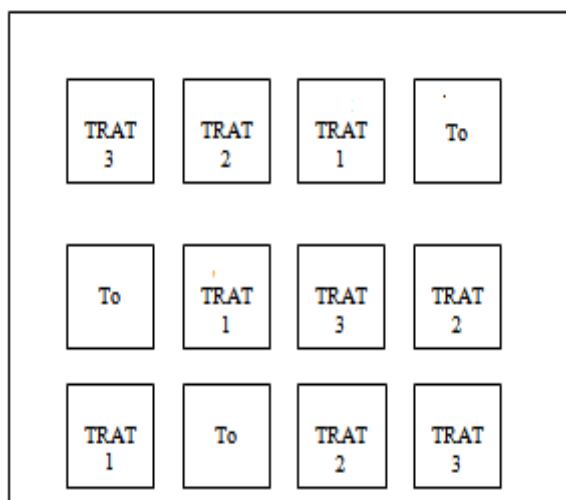


Labores culturales



Medición de variables

ANEXO 3 Croquis de experimento



- TRAT 1 → Tratamiento 1/100
- TRAT 2 → Tratamiento 1/1000
- TRAT 3 → Tratamiento 1/10000
- TRAT 4 → Testigo

Tamaño de la parcela $2 \times 2 = 2\text{m}^2$

Distancia entre parcelas 0.5m aproximadamente

Área total 66,5 m²

ANEXO 4. Análisis de varianza de las variables que fueron parte del estudio

Análisis de varianza para la variable del hongo patógeno (*Botrytis* sp).

FUENTES DE VARIACION	G.L.	SC	CM	FC	FT (0,05)	
TRATAMIENTOS	11	3	12,23	0,04	4,26	NS
ERROR	2	8	316,72			
TOTAL	9	11	328,95			
C.V.		1,65%				

NS. No Significativo al nivel de 0,05

Análisis de Varianza para altura de planta en tratamiento y bloques.

Fuente de variación	G.L.	CM	SC	Fc	Ft(0,05)	Sig.
Tratamiento	1	1330,3	1330,3	5,59	4,35	ns
Bloque	2	687,3	1374,7	5,78	5,85	ns
Error	20	8,5	237,9			
Total	24					

C.V. 14,77%

NS. No Significativo al nivel de 0,05

Análisis de Varianza para área foliar en tratamiento y bloques.

Fuente de variación	G.L.	CM	SC	Fc	Ft(0,05)	Sig.
Dosis	1	3476,3	3476,3	7,2	4,35	*
Bloque	2	1395,5	2790,9	5,8	5,85	Ns
Error	20	8,6	480,6			
Total	24					

*, Significativo al nivel de 0,05.

C.V. 14,66 %

Análisis de varianza para biomasa total en tratamiento y bloques.

Fuente de variación	G.L.	CM	SC	Fc	Ft(0,05)	Sig.
Tratamiento	1	191,0	191,0	3,55	4,35	*
Bloque	2	115,7	231,3	4,30	3,49	ns
Error	20	2,7	53,8			
Total	24					

*, Significativo al nivel de 0,05.

C.V. 7,07%

Duncan para materia verde de tratamiento

Aplicación	Promedio	Duncan
Tratamientos	5,45	a
Testigo	4,25	b

Análisis de Varianza para largo de vaina en tratamiento y bloques.

Fuente de variación	G.L.	CM	SC	Fc	Ft(0,05)	Sig.
Tratamiento	1	835,8	835,8	4,58	4,35	*
Bloque	2	432,7	865,4	4,75	5,85	ns
Error	20	8,5	182,4			
Total	24					

*, Significativo al nivel de 0,05.

C.V. 14,77%

Duncan para largo de vaina en tratamiento

Aplicación	Promedio	Duncan
Tratamiento	9	A
Testigo	5	b

Análisis de Varianza para el variable peso de vaina en tratamiento y bloques.

Fuente de variación	G.L.	CM	SC	Fc	Ft(0,05)	Sig.
Tratamiento	1	1160,6	1160,6	4,54	4,35	*
Bloque	2	592,2	1184,5	4,63	5,85	ns
Error	20	8,5	255,6			
Total	24					

*, Significativo al nivel de 0,05.

C.V. 14,77%

Duncan para peso en vaina en tratamiento.

Aplicación	Promedio	Duncan
Tratamiento	10,5	a
Testigo	7,3	b