

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE
Trichoderma inhamatum (cepa BOL – 12 QD), FRENTE A
Botrytis fabae, CAUSANTE DE LA MANCHA CHOCOLATE
EN CULTIVOS DE HABA (Vicia faba)**

ELABORADO POR: CHRISTIAN RENÉ ESPINAL CHURATA

ASESORES: LUIS ENRIQUE TERRAZAS SILES Ph D.
ALBERTO GIMENEZ TURBA Ph D.

TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

**LA PAZ – BOLIVA
2009**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE
Trichoderma inhamatum (cepa BOL – 12 QD), FRENTE A
Botrytis fabae, CAUSANTE DE LA MANCHA CHOCOLATE
EN CULTIVOS DE HABA (Vicia faba)**

ELABORADO POR: CHRISTIAN RENÉ ESPINAL CHURATA

AREA: BIOTECNOLOGÍA FÚNGICA

TESINA DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

**LA PAZ – BOLIVA
2009**

A Dios:

Por ser mi creador, el motor de mi vida, por no haber dejado que me rinda en ningún momento e iluminarme para salir adelante, porque todo lo que tengo, lo que puedo y lo que recibo es regalo que él me ha dado.

A la razón de mi ser:

Mi familia.

Mis padres Felipe y Florencia.

Por su amor, trabajo y sacrificios en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

Mis hermanos Aleida, Marcel, Rebeca y Carola.

Por su confianza, comprensión y cariño que siempre han demostrado.

Agradecimientos

A la cooperación ASDI/SAREC, cuyo apoyo al proyecto de Biodiversidad Microbiana del IIFB, nos permite desarrollar aquello que tanto nos agrada, la investigación.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, por haberme permitido formarme como profesional, para trabajar por el desarrollo de nuestra patria.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, por la acogida brindada para el desarrollo de este trabajo.

A la Comunidad Chua Cocani, en especial a los hermanos y hermanas de la Asociación "Flor de Haba" muchas gracias por su valiosa cooperación.

A mi asesor, profesor Enrique Terrazas Siles, quien me orientó, apoyó y corrigió, no solo en el desarrollo y conclusión de este proyecto, sino que también, en el ámbito personal, muchas gracias doctor.

Al profesor Alberto Giménez Turba, por su valiosa guía, atinados consejos e innumerables sugerencias.

Al Ingeniero Agrónomo Ramón Puño, amigo y compañero de trabajo, muchas gracias por compartir tus conocimientos.

Al Ingeniero Agrónomo Marco Antonio Huanca (PROINPA), por su participación desinteresada en el diseño de las pruebas de campo.

A mis tribunales de tesina, Dr. Miguel Estenssoro Cernadas y Dr. Pablo Irahola Schemeisser por las sugerencias y correcciones realizadas.

Al Dr. Julio Pérez González, Docente de la Cátedra de Fisiopatología, por la paciencia, confianza y por todo el empeño empleado en nuestra formación como profesionales.

A Mariela Arias, por su gran cariño, apoyo, comprensión e impulso dado para alcanzar esta meta. Todo mi amor, respeto y gratitud eterna.

A mi gran amigo Ricardo Grados, por que siempre me diste una mano en todo aspecto, donde quiera que estemos seguiremos luchando por nuestro 0.01 %, gracias Rick.

A Georgina Chávez, por abrir nuestras mentes hacia nuevos horizontes y mostrarnos que están tan cerca como nosotros queramos.

A mi pata Tony "Sheshin" Vela, mi hermana Eliana "Shelys" Sandagorda, compañeros del internado con quienes compartí grandes experiencias tanto científicas como sociales; A Crispín Paredes, muchas gracias por tus palabras de amistad y aliento, Julio Gutiérrez, Julio Vallejos, Néstor Condori, Reynaldo Tenorio, Fabiola Llanos, Patricia Sánchez, Boris Espinoza e Iván Limachi, esta va por ustedes amigos a lo cubano.

A David, Fabia, Mirna y Patty, por su incondicional apoyo, confianza y amistad, no solo en el aula, sino fuera de ella y en todo momento, muchas gracias.

A los alumnos de la cátedra de Fisiopatología, por su amistad y confianza, sigan con el mismo ímpetu hasta llegar a sus metas.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de este proyecto, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

De nuestra incapacidad de dejar en paz;
del gran fervor por lo nuevo y el desagrado por lo antiguo; de anteponer el conocimiento a
la sabiduría, la ciencia al arte; y la habilidad al sentido común;
de la vanagloria de insignificantes descubrimientos;
de hacer que estos en lugar de auxiliar a la humanidad, lleven a la debacle de la misma,
líbranos Dios mío.

Sir Robert Hutchinson

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	xi
SUMMARY	xii
ABREVIATURAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
CARACTERISTICAS GENERALES DEL HABA	3
1.1	Clasificación taxonómica 3
1.2	Variedades botánicas 3
1.3	Morfología 3
1.4	Requerimientos climáticos 5
1.5	Particularidades del cultivo de haba 6
1.5.2	Siembra 6
1.5.3	Abonado 6
1.6	Plagas y enfermedades 6
1.6.1	Plagas 6
1.6.1.1	Pulgón negro (<i>Aphis fabae</i>) 6
1.6.1.2	Sitonia (<i>Sitona lineatus</i>) 7
1.6.2	Enfermedades 7
1.6.2.1	<i>Roya (Uromyces fabae)</i> 7
1.6.2.2	<i>Botrytis (Botrytis fabae)</i> 8
CAPITULO II	
EI HABA EN BOLIVIA	9
2.1	Origen 9
2.2	Condiciones Climáticas para el cultivo 9
2.3	Importancia del haba en Bolivia 9
2.4	Importancia económica 11
2.5	Factores limitantes en la producción de haba 12
2.6	Comercialización del haba 13
2.7	Procesamiento agroindustrial 13
CAPITULO III	
Botrytis fabae “MANCHA CHOCOLATE”	
3.1	Síntomas 14
3.2	Infestación 15
3.3	Penetración 15
3.4	Infección 16

3.5	Resistencia a la enfermedad	16
3.6	Dispersión	17
3.7	Sobrevivencia	17
3.8	Fuente de inóculo	17
3.9	Efecto de los factores ambientales	17
3.9.1	Temperatura de crecimiento	18
3.9.2	Temperatura de esporulación	18
3.9.3	Temperatura de germinación	18
3.9.4	Temperatura par la formación de esclerocios	18
3.9.5	Humedad	18
3.10	Características morfológicas	19
3.10.1	Micelio y estructuras reproductivas asexuales	19
3.10.2	Esclerocios	19

CAPITULO IV

UNA NUEVA MANERA DE APROVECHAR LOS MICROORGANISMOS, EL CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES MEDIANTE *T. inhamatum* spp

21

4.1	Definición	21
4.2	<i>Trichoderma</i> spp	21
4.2.1	Características de <i>Trichoderma</i>	21
4.2.1.1	Micoparasitismo y enzimas líticas	22
4.2.1.2	Antibiosis y metabolitos secundarios	22
4.3	<i>Trichoderma</i> – planta – patógeno	23
4.4	Caracterización filogenética de la cepa <i>Trichoderma</i> spp BOL - 12 QD	23

CAPITULO V

ASPECTOS INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO SECUNDARIO

25

5.1	Regulación del metabolismo secundario en hongos	25
5.2	Formación de metabolitos secundarios en cultivos de batch	25
5.3	Factores reguladores de la síntesis de metabolitos	26
5.3.1	Regulación de la fuente de carbono	26
5.3.2	Represión de la fuente de nitrógeno	27
5.3.3	Regulación del fosfato	27
5.3.4	Índice de crecimiento	28
5.3.5	Interrupción de la biosíntesis	28
5.3.5.1	Carencia de enzimas sintetetasas	28
5.3.5.2	Autorregulación	28
5.4	Otros factores	29
5.4.1	Metales	29
5.4.2	Oxígeno	29
5.4.3	Luz	29
5.4.4	Temperatura	29

CAPITULO VI	JUSTIFICACIÓN	31
CAPITULO VII	OBJETIVOS	33
CAPITULO VIII	MATERIALES Y METODOS	34
8.1	Hongo patógeno	34
8.1.1	Procedencia del patógeno <i>B. fabae</i>	34
8.1.2	Aislamiento de <i>B. fabae</i>	34
8.1.3	Reproducción del efecto patogénico en plantas (postulados de Koch).	34
8.1.4	Identificación del hongo patógeno	35
8.2	Hongos biocontroladores	35
8.2.1	Procedencia del hongo biocontrolador	35
8.2.2	Activación de las cepas de estudio	35
8.3	Evaluación de la actividad biocontroladora	35
8.3.1	Prueba de interacción patógeno – antagonista	35
8.3.2	Prueba de cinética de crecimiento	36
8.4	Producción de metabolitos secundarios antagonistas	36
8.4.1	Parámetros físicos	36
8.4.1.1	Evaluación del efecto de luz sobre <i>T. inhamatum</i> cepa BOL 12 – QD	36
8.4.1.2	Implementación de agitación y aeración en los medios de cultivo	36
8.4.2	Parámetros Químicos	37
8.4.2.1	Evaluación de la adición de Nitrato de amonio en el caldo de cultivo PDC	37
8.4.2.2	Evaluación de la Temperatura, fuente de carbono y pH	38
8.4.3	Parámetros Biológicos	39
8.4.3.1	Co – cultivo del patógeno mediante uso de esporas	39
8.4.3.2	Co – cultivo del patógeno mediante uso de biomasa	40
8.5	Actividad biocontroladora del fermento	40
8.6	Actividad enzimática del hongo antagonista y patógeno	41
8.6.1	Evaluación cualitativa de la producción enzimática de <i>T. inhamatum</i> y <i>B. fabae</i> en medio de cultivos específicos	41
8.6.2	Evaluación cuantitativa de la producción enzimática de <i>T. inhamatum</i> en medio PDC	41
8.6.2.1	Obtención de sobrenadantes	41
8.6.2.1.1	Actividad glucolítica y xilanolítica	41
8.6.2.1.2	Actividad amilolítica	42
8.6.2.1.3	Actividad pectinolítica	43
8.6.2.1.4	Actividad quitinolítica	44
8.7	Evaluación de la actividad del fermento en las parcelas de haba (prueba de campo)	45
8.7.1	Preparación de Biorreactor para la producción de 20 L de fermento de <i>T. inhamatum</i> BOL – 12 QD.	45
8.7.2	Diseño del terreno, ecotipos de estudio y tratamientos	45

8.7.3	Preparación de los tratamientos	46
8.7.3.1	Tricobio Cochabamba	46
8.7.3.2	Biosulfocal	46
8.7.3.3	<i>Trichoderma inhamatum</i> BOL – 12 QD	47
8.7.3.4	Esporas <i>Trichoderma spp</i> Cochabamba	47
8.7.4	Aplicación de los tratamientos	47
8.7.5	Evaluación de las parcelas por tratamiento y por unidades experimentales	47
8.8	Cosecha	48
8.8.1	Cosecha de las unidades experimentales	48
8.8.2	Cosecha del producto por tratamiento y ecotipo	48
8.8.3	Trillado y venteado	48
8.9	Análisis de datos	49

CAPITULO IX

RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1	Hongo patógeno	50
9.1.1	Aislamiento del microorganismo causante de la mancha chocolate	50
9.1.2	Identificación del hongo patógeno	51
9.1.3	Observación macroscópica	51
9.2	Evaluación de la actividad biocontroladora	52
9.2.1	Prueba de interacción patógeno - antagonista	52
9.3	Evaluación de la producción de metabolitos secundarios antagonistas	53
9.3.1	Parámetros físicos	53
9.3.1.1	Evaluación del efecto de luz sobre <i>T. inhamatum</i> cepa BOL – 12 QD	53
9.3.1.2	Implementación de agitación y aeración en los medios de cultivo	55
9.3.2	Parámetros químicos	57
9.3.2.1	Evaluación de la adición de nitrato de amonio	57
9.3.3	Parámetros biológicos	59
9.3.3.1	Co – cultivo del patógeno mediante el uso de esporas	59
9.3.3.2	Co – cultivo del patógeno mediante el uso de biomasa atenuada	61
9.4	Efecto de la fuente de carbono, temperatura y pH	64
9.5	Actividad enzimática del hongo antagonista y patógeno	65
9.5.1	Evaluación de la producción enzimática de <i>T. inhamatum</i> y <i>B. fabae</i> en medios de cultivo específicos	65
9.5.2	Evaluación cuantitativa de la producción de <i>T. inhamatum</i> en medio PDC	67
9.5.2.1	Actividad celulolítica	67
9.5.2.2	Actividad Xilanolítica	68
9.5.2.3	Actividad Amilolítica	69
9.5.2.4	Actividad Pectinolítica	70
9.5.2.5	Actividad Quitinolítica	71
9.6	Comparación de la actividad del fermento 12 QD, respecto otros controladores biológicos en parcela de haba (prueba de campo)	72
9.6.1	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre la altura de las plántulas de haba	72
9.6.2	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de la	74

	plántula de haba	
9.6.3	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de la plántula de haba	75
9.6.4	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre la longitud de vaina en plántula de haba	76
9.6.5	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el número de vainas en plántula de haba	78
9.6.6	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de vaina por plántula de haba	79
9.6.7	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el número de grano verde por plántula de haba	81
9.6.8	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de grano verde por plántula de haba	83
9.6.9	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de grano seco por plántula de haba	82
9.6.10	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el porcentaje de severidad por plántula de haba	85
9.6.11	Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el rendimiento de la parcela de estudio a la conclusión del secado de las calchas	86

CAPITULO X	CONCLUSIONES	90
CAPITULO XI	PROYECCIONES Y RECOMENDACIONES	92
CAPITULO XII	REFERENCIAS	93

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Sintomatología de la mancha Chocolate	14
Figura 2	Estructuras químicas de metabolitos secundarios aisladas a partir de <i>Trichoderma spp</i> 1: T22azafilona; 2: T39butenolida; 3: harzianolida; 4: dehidroharzianolida; 5: harzianopiridina; 6: 6-pentil- -pirano; 7: 1-hidroxi-3-metil-antraquinona; 8: 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona; 9: harziandiona; 10: koninginina A; 11: ácido heptedelico; 12: trichoviridina; 13: ácido harcianico; 14: gliotoxina; 15: gliovirina; 16: viridina; 17: viridiola; 18: trichorzianina, (1991).	23
Figura 3	Esquema de medio de cultivo PDC en batch sometidos en: agitación - aeración, aeración, agitación y estanco (IIFB – 2008).	37
Figura 4	Diagrama de la distribución del terreno de estudio, según ecotipo (A: Isla del Sol; B: Gigante Copacabana) y Tratamiento (1. Testigo, 2. Tricobio Cochabamba, 3. Biosulfocal, 4. <i>Trichoderma inhamatum</i> BOL – 12 QD, 5. Esporas <i>Trichoderma</i> Cochabamba), (Chua Cocani – 2008).	46
Figura 5	Postulados de Koch; A. Día primero de inóculo de las esporas patógenas. B Presencia de la sintomatología de mancha chocolate, (IIFB – 2008).	50
Figura 6	Postulados de Koch. A. Inicio de la infección causada por <i>B. fabae</i> luego de 5 días. B. Control inóculado con agua estéril donde no se observa infección alguna los 5 días, (IIFB – 2008).	51
Figura 7	Características morfológicas de <i>B. fabae</i> ; A. Lado anverso. B. Lado reverso, (IIFB – 2008).	51
Figura 8	Inhibición por contacto, <i>T. inhamatum</i> y el patógeno <i>B. fabae</i> luego de 15 días. Obsérvese la formación del halo de inhibición y un crecimiento acelerado por parte del controlador (<i>T. inhamatum</i>), (IIFB – 2008).	52
Figura 9	Inhibición por solapamiento. Cepa BOL 162 QD y <i>B. fabae</i> , luego de 7 días: Obsérvese como el hongo controlador sobrepasa, cubre y micoparasita al hongo patógeno en una forma de competición por nutrientes, (IIFB – 2008).	53
Figura 10	Porcentaje de inhibición en el crecimiento de <i>B. fabae</i> , ocasionado por efecto del fermento de <i>T. inhamatum</i> sometido a diferentes filtros de luz, (IIFB – 2008).	54
Figura 11	Porcentaje de inhibición en el crecimiento de <i>B. fabae</i> , ocasionado por efecto de los parámetros físicos aplicados a los cultivos en batch de <i>T. inhamatum</i> , (IIFB – 2008).	56
Figura 12	Porcentaje de inhibición en el crecimiento de <i>B. fabae</i> , ocasionado por efecto de fermento de <i>T. inhamatum</i> sometido a diferentes filtros de luz con la adición de nitrato de amonio al medio, (IIFB – 2008).	58
Figura 13	Porcentaje de inhibición en el crecimiento de <i>B. fabae</i> , ocasionado por efecto del co – cultivo de esporas de <i>B. fabae</i> en fermentos de <i>T. inhamatum</i> , (IIFB – 2008).	60
Figura 14	Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de <i>B. fabae</i> , ocasionado por efecto del fermento de <i>T. inhamatum</i> , producido a diferentes concentraciones prop/mL de <i>B. fabae</i> , y <i>T. inhamatum</i> , (IIFB – 2008).	61
Figura 15	Porcentaje de inhibición en el crecimiento de <i>B. fabae</i> , ocasionado por efecto del co – cultivo de biomasa de <i>B. fabae</i> en fermentos de <i>T. inhamatum</i> , (IIFB – 2008).	62

Figura 16	Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de <i>B. fabae</i> , ocasionado por efecto del fermento de <i>T. inhamatum</i> , producido a diferentes concentraciones de biomasa de <i>B. fabae</i> y prop/mL de <i>T. inhamatum</i> , (IIFB – 2008).	63
Figura 17	Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de <i>B. fabae</i> , ocasionado por efecto del fermento de <i>T. inhamatum</i> , producido a diferentes: fuentes de carbono, temperatura y pH, (IIFB – 2008).	65
Figura 18	Actividad enzimática celulolítica de <i>T. inhamatum</i> BOL – 12 QD, medida en medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y estanco, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).	68
Figura 19	Actividad enzimática xilanolítica de <i>T. inhamatum</i> BOL – 12 QD, medida en los medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y estanco, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).	69
Figura 20	Actividad enzimática amilolítica de <i>T. inhamatum</i> BOL – 12 QD, medida en los medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y estanco, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008)	70
Figura 21	Actividad enzimática pectinolítica de <i>T. inhamatum</i> BOL – 12 QD, medida en los medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y estanco, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).	71
Figura 22	Actividad enzimática quitinolítica de <i>T. inhamatum</i> BOL – 12 QD, medida en los medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y estanco, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).	72
Figura 23	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma</i> spp) sobre la altura de las plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).	73
Figura 24	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma</i> spp) sobre el peso de plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).	74
Figura 25	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma</i> spp), sobre el número ramas de plántulas de haba, (IIFB – 2009).	75
Figura 26	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma</i> spp), sobre la longitud de vainas por plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).	77
Figura 27	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma</i> spp), sobre el número vainas de plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).	78
Figura 28	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma</i> spp), sobre el peso de vainas de plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).	80
Figura 29	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma</i> spp), sobre el número de grano verde por plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).	81

Figura 30	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma spp</i>), sobre el peso de grano verde por plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).	82
Figura 31	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana , 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma spp</i>) sobre el peso de grano seco por plántula de haba, (Chua Cocani – 2009).	84
Figura 32	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana , 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: 12 – QD (<i>Trichoderma inhamatum</i>), 5: Esporas <i>Trichoderma spp</i>) sobre el porcentaje de severidad por plántula de haba, (Chua Cocani – 2009).	85
Figura 33	Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: <i>Trichoderma inhamatum</i> BOL 12 – QD, 5: Esporas <i>Trichoderma spp</i>) sobre el rendimiento total de la parcela de estudio, (Chua Cocani – 2009).	87

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición bromatológica en base a grano seco, MAGDER, Cultivo de haba 2002.	10
Tabla 2	Superficie cultivada, producción y rendimiento de haba en Bolivia: Ministerio de Agricultura y Ganadería - Elaboración: Muller Asociados 2005.	11
Tabla 3	Diseño experimental de la evaluación de temperatura, fuente de carbono y pH, (IIFB – 2008).	38
Tabla 4	Diseño factorial de la prueba co – cultivo mediante el uso de esporas, (IIFB – 2008).	39
Tabla 5	Diseño factorial de la prueba de co – cultivo con el empleo de biomasa, (IIFB – 2008).	40
Tabla 6	Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática celulolítica y xilanolítica, (IIFB – 2006).	42
Tabla 7	Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática amilolítica, (IIFB – 2008).	43
Tabla 8	Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática pectinolítica, (IIFB – 2008).	43
Tabla 9	Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática quitinolítica, (IIFB – 2008).	44
Tabla 10	Efecto de distintos filtros de luz sobre la producción de metabolitos secundarios por <i>T. Inhamatum</i> y su influencia en la inhibición del crecimiento <i>B. fabae</i> , (IIFB – 2008).	54
Tabla 11	Evaluación de la actividad de los cultivo en batch sometidos a parámetros físicos (1: Agitación – aeración; 2: Aeración; 3: Agitación; 4: Estanco), sobre la producción de metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas por <i>T. Inhamatum</i> BOL 12 – QD y su influencia en la inhibición del crecimiento <i>B. fabae</i> , a los 30 días de experimentación, (IIFB – 2008).	55
Tabla 12	Efecto de la luz y la adición de Nitrato de Amonio al medio PDC, sobre la producción de metabolitos secundarios por <i>T. inhamatum</i> y su influencia en la inhibición del crecimiento <i>B. fabae</i> , (IIFB – 2008).	57
Tabla 13	Efecto de la concentración de prop/mL de <i>B. fabae</i> y <i>T. inhamatum</i> , sobre la producción de metabolitos secundarios <i>T. inhamatum</i> BOL 12 – QD y su influencia en la inhibición del crecimiento <i>B. fabae</i> , (IIFB – 2008).	59
Tabla 14	Efecto de la Biomasa de <i>B. fabae</i> y la concentración de prop/mL de <i>T. inhamatum</i> , sobre la producción de metabolitos secundarios del mismo y su influencia en la inhibición del crecimiento <i>B. fabae</i> , (IIFB – 2008).	62
Tabla 15	Efecto de la Fuente de Carbono, temperatura y pH, sobre la producción de metabolitos secundarios y su influencia en la inhibición del crecimiento <i>B. fabae</i> , (IIFB – 2008).	64
Tabla 16	Resultados del análisis cualitativo de la actividad enzimática de <i>T. inhamatum</i> - <i>B. fabae</i> , (IIFB – 2008).	66
Tabla 17	Evaluación de la altura de 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	72
Tabla 18	Evaluación del peso de 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	74

Tabla 19	Evaluación del número de ramas en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	75
Tabla 20	Evaluación de la longitud de vaina de 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	76
Tabla 21	Evaluación del número de vaina en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	78
Tabla 22	Evaluación del peso de vainas en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	79
Tabla 23	Evaluación del número de grano verde en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	81
Tabla 24	Evaluación del peso de grano verde en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	82
Tabla 25	Evaluación del peso de grano seco en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (135 días), (Chua Cocani – 2009).	83
Tabla 26	Evaluación del porcentaje de severidad por plántula de haba en 180 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).	85
Tabla 27	Evaluación del peso de grano seco por parcelas, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica y secado de las calchas (155 días), (Chua Cocani – 2009).	86

RESUMEN

La Mancha Chocolate en el haba, es causada por el hongo fitopatógeno *Botrytis fabae*, esta influye en su rendimiento y producción de forma significativa. Este hongo patógeno es muy virulento y puede reducir hasta dos tercios del rendimiento del cultivo. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad del biocontrolador *Trichoderma inhamatum* (cepa BOL 12 – QD) frente a *Botrytis fabae* (cepa BOL QJ 1) causante de la mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*). El antagonismo se evaluó por el método de enfrentamiento dual, donde se observó la competencia por el sustrato, micoparasitismo y antibiosis. En tal virtud se evaluó la influencia de parámetros físicos, químicos y biológicos en cultivos de batch de *T. inhamatum* y la capacidad de estos sobre el control de *B. fabae*. El porcentaje de inhibición de *B. fabae* obtenido con el fermento control de *T. inhamatum* BOL 12 QD, fue de 42.80 %. Al emplearse filtro de luz violeta el porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae* fue de 52.84%. Bajo el parámetro de agitación en cultivos de batch se reportó 61.11 % de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*. Cuando se adicionó nitrato de amonio al medio de cultivo, el porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae* fue 11.52 %. Al emplear cascara de papa a una temperatura de 22 °C y pH 5, se encontró 54.74 % de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*. En el co-cultivo con esporas de *T. inhamatum* cepa BOL 12 QD (10^6 prop/mL) con *B. fabae* (10^2 prop/mL), la inhibición en el crecimiento de *B. fabae* fue 51. 21 %. Al emplear biomasa de *B. fabae* (500 mg) con esporas de *T. inhamatum* cepa BOL 12 QD (10^6 prop/mL) el porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae* fue 55.11 %. La actividad enzimática encontrada fue: actividad celulolítica bajo agitación- aeración 100.69 UI/L a los 28 días, actividad xilanolítica 69.22 UI/L, a los 7 días bajo agitación-aeración; actividad amilolítica 183.33 UI/L a los 14 días, bajo aeración; actividad pectinolítica 12.41 UI/L bajo aeración a los 7 días; y actividad quitinolítica 294 mmol/L mg N-acetilglucosamina liberados, a los 21 días. La aplicación del fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD, sobre las plántulas de haba presentó una significancia ($p < 0.05$), sobre las variables: peso de plántula, longitud de vaina, número de vaina, peso de vaina, número de grano, peso de grano verde y peso de grano seco, respecto los tratamientos biológicos (Tricobio, Biosulfocal y esporas de *Trichoderma spp*). El peso de grano seco total obtenido por la aplicación de *T. inhamatum* BOL 12 QD fue de 3,333 Kg/Ha en la variedad Gigante Copacabana y en la variedad Isla del Sol de 2,533 Kg/Ha.

Palabras clave: Mancha chocolate, *Botrytis fabae*, *Trichoderma*, Micoparasitismo, Antibiosis.

SUMMARY

Chocolate spot disease in the breath bean, is caused by the fungus *Botrytis fabae*, which influences in the yield and production in a significant way. This fungus hogen is very virulent in breath beans. This pathogen can reduce until two thirds of the yield of the cultivation. The present work has as objective to evaluate the activity of the biocontroler *Trichoderma inhamatum* (strain BOL 12 - QD) against of *Botrytis fabae*, causing of the chocolate spot in breath bean cultivations (*Vicia faba*). The antagonism was evaluated by the method of dual confrontation, where the competition was observed by the substrate, micoparasitism and antibiotic production. In such a way the influence of physical, chemical and biological parameters were evaluated in batch cultures of *T. inhamatum* and the hability of these in the control of *B. fabae*. The percentage of inhibition of *B. fabae* obtained with the ferment control of *T. inhamatum* BOL 12 QD, was 42.80%. When a filter of light violet the inhibition percentage in the growth of *B. fabae* was 52.84%. Under agitated batch cultures the inhibition repted was 61.11 % in the growth of *B. fabae*. When ammonium nitrate was added to the cultura médium, the inhibition percentage in the growth of *B. fabae* was 11.52%. When potato husk added to temperature of 22 °C and pH 5, the inhibition of the growth of *B. fabae* was 54.74 %. In the co-culture with spores of *T. inhamatum* BOL 12 QD (10^6 prop/mL) with *B. fabae* (10^2 prop/mL), had an inhibition of the 51. 21%. When using biomass of *B. fabae* (500 mg) with spores of *T. inhamatum* BOL 12 QD (10^6 prop/mL) the inhibition percentage in the growth of *B. fabae* was 55.11%. The enzymatic activity was found: celulolític activity low agitation - aeration 100.69 UI/L at 28 days; xylanolític activity 69.22 UI/L, at 7 days low agitation-aeration; amylolític activity 183.33 UI/L at 14 days, low aeration; pectynolític activity 12.41 UI/L low aeration; and quytinolític activity of 294 mmol/L mg N-acetilglucosamin at 21 days.

The application of the ferment of *T. inhamatum* BOL 12 QD, on the breath bean plant shows a significat ($p < 0.05$), on the variables: plant weight, husk longitude, husk number, husk weight, grain number, weight of green grain and weight of dry grain, concerning the biological treatments (Tricobio, Biosulfocal and spores of *Trichoderma spp*).

The total weight of dry obtained by the application of *T. inhamatum* BOL 12 QD was 3,333 Kg/Ha in the Gigante Copacababa variety and in the variety Isla del Sol of 2,533 Kg/Ha.

KEY WORDS: Chocolate spot, *Botrytis fabae*, *Trichoderma*, Micoparasitism, Antibiotic.

ABREVIATURAS

atm: Atmosferas

°C: Grados Celsius

DNS: Acido dinitrosalicilico

IBTA: Instituto Boliviano

IIFB: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas

FCFB: Facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas

g: gramo

M: mol

mg: miligramo

mL: mililitro

mm: milímetro

min: minutos

msnm: metros sobre el nivel del mar

nm: nanometros

Kg: Kilogramo

Km: Kilometro

Ha: Hectárea

mmol: milimoles

prop: propágulos

PDA: Agar Patata Dextrosa

PDC: Caldo Patata Dextrosa

PROINPA: Promoción e Investigación de Productos Andinos

rpm: revoluciones por minuto

UI: Unidades Internacionales

μL: microlitro

INTRODUCCION

Los métodos tradicionales de protección en cultivos agrícolas de las enfermedades, han sido principalmente basados en el uso de pesticidas químicos. Las aplicaciones de fungicidas y fungistáticos tienen efectos nocivos en el ambiente - consumidor, y es a menudo aplicado en cantidades aun más amplias que los herbicidas e insecticidas en los campos de producción.

Los métodos químicos a pesar de su bajo costo, no son a la larga tan baratos, porque contribuyen a la contaminación de la atmósfera, daño del medio ambiente, dejando residuos químicos en el terreno de producción, que pueden llevar al desarrollo de resistencia entre los microorganismos (Naseby et al., 2000).

La biotecnología agrícola y vegetal en los últimos 15 años ha proporcionado soluciones a los problemas de plagas, hongos y parásitos de plantas, por medio del desarrollo de cultivos transgénicos. Estas plantas transgénicas han sido mejoradas por medio de una transformación en su genoma original; portan una o varias nuevas características genéticas tendentes a sobrellevar problemas provocados, por la presencia de plagas, hongos o parásitos de las plantas. Hoy, existen plantas que producen su propio plaguicida de forma natural evitando la aplicación de agroquímicos en los cultivos. Sin embargo, el desarrollo y utilización de plantas transgénicas se ha visto limitado a escala mundial debido a aspectos legislativos sobre su utilización. Grupos ambientalistas y diversas políticas económicas se han opuesto a la utilización y masificación de cultivos transgénicos. La legislación relacionada con la utilización de cultivos transgénicos es particular para cada país, pero de manera general se ha limitado de forma importante la utilización de plantas transgénicas debido a la aplicación de principios de precaución.

Uno de los problemas más grandes que enfrenta la agricultura en Bolivia desde hace mucho tiempo está relacionado con el ataque de los cultivos de importancia económica por plagas, enfermedades, provocadas por diversos organismos. Durante mucho tiempo se han utilizado agroquímicos para el control de plagas (plaguicidas) y patógenos de plantas, los cuales han logrado el control y estabilización de los cultivos.

La principal problemática que atinge al Altiplano Boliviano es la fitoenfermedad Mancha Chocolate, causada por *Botrytis fabae*, que ataca a los cultivos de haba, esta enfermedad afecta a las hojas tallos, flores, vainas verdes, grano de haba y llega a destruir por completo los cultivos, ocasionando un detrimento en su producción. Pero este fenómeno no solo afecta a los

productores de haba, sino también a la economía nacional, pues el comercio de haba a nivel internacional sería reducido y perderíamos mercado. Aunque las características patológicas no solo son las únicas limitantes para la producción, sino que también está el uso de agroquímicos para el control de esta enfermedad, lo cual reduce aún más el mercado, debido a normas que regulan las exportaciones de productos alimenticios.

Frente a estas adversidades y las limitaciones en lo referido a la utilización de cultivos transgénicos, el mercado agrícola sigue abierto a la utilización de métodos biológicos afines al medio ambiente para el combate de plagas, hongos y parásitos de plantas. Uno de los medios más prometedores para lograr esta meta, es por el uso basado en agentes con capacidad biocontroladora (Chet & Inbar, 1994; Harman & Kubicek, 1998). Hasta la fecha, existen varios controladores biológicos que han sido registrados y están disponibles como productos comerciales, entre los que están producidos por bacterias tenemos: *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacilos*, y del género fúngico a: *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Ampelomyces*, *Candida* y *Coniothyrium*.

Los hongos del género *Trichoderma spp* están presentes en casi todos los suelos agrícolas. El interés en este género proviene esencialmente de sus propiedades enzimáticas y antibióticas; estas facultades de antagonismo de *Trichoderma spp* han sido descritas desde el siglo pasado por Vuillemin (1887) y actualmente este hongo es uno de los microorganismos mayormente empleados en el campo agrícola. Las especies de *Trichoderma* que frecuentemente se utilizan para el biocontrol, son las especies *harzianum* y *viride*, de las cuales la primera es la que ha sido más estudiada.

En tal razón en el presente trabajo se pretende: Evaluar la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* (cepa BOL 12 – QD), frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*).

CAPITULO I

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL HABA

1.1 Clasificación taxonómica

Según Waaijenberg, (1996) la posición taxonómica de esta especie es la siguiente:

Sub reino: Fanerógamas
División: Magnoliophyta (Angiospermas)
Clase: Magnoliopsida (Dicotiledonias)
Subclase: Rosidae
Orden: Fabales;
Familia: Fabaceae (Leguminosae)
Sub-familia: Papilionoideae; Tribu: Vicieae
Género: *Vicia*;
Especie: *Vicia faba* L;
Nombre común: Haba

1.2 Variedades botánicas

Según Crespo (1996), diversas clasificaciones botánicas han sido propuestas por muchos científicos y taxónomos (Muratova 1931; Hanelt 1972; Cubero 1974). La clasificación de Cubero (1974) es la más simple y reconoce sólo cuatro variedades botánicas: *major*, *equina*, *minor* y *paucijuga*. La variedad botánica *paucijuga* es la silvestre y las tres *major*, *equina* y *minor* son variedades cultivadas.

1.3 Morfología

El haba es una planta anual de consistencia herbácea (Mateo 1961; Orellana & Cadena, 1992) que presenta en sus órganos las siguientes características físicas:

Raíz

La raíz es pivotante y adquiere generalmente gran desarrollo alcanzando hasta 1.5 m de profundidad. La raíz principal es vigorosa, profunda y se lignifica considerablemente. Las raíces secundarias son menos desarrolladas y por característica general en estas se forman nódulos, donde se alojan las bacterias del género *Rhizobium*.

Tallo

El tallo es de porte erguido, fistuloso y robusto, de sección cuadrangular y glabra de 5 a 10 mm de diámetro de consistencia herbácea en los primeros estadios y variando en altura desde 0.50 a 1.80 m, dependiendo de la variedad, densidad de siembra, fertilidad del suelo y condiciones ecológicas, asimismo toma consistencia leñosa a la cosecha, forma macollos que nacen en el cuello de la planta o en la base del tallo y el número fluctúa dependiendo de la variedad, en casos óptimos alcanza hasta 12 siendo su promedio de 4 a 6 macollos, el color es variable desde verde al verde rojizo (Agrios 1996).

Hojas

Las hojas son compuestas paripinadas, con 4 a 7 folíolos glabros opuestos o alternados de borde entero o dentadas en el ápice, de forma elíptica, ovoide o lineal que casi siempre son anchos y netamente faciales. La cara superior o haz, suele ser de color verde más intenso, menos nervosa que la cara inferior o envés (Agrios 1996).

Fruto

El fruto es una vaina o legumbre gruesa, carnosa alargada y algo comprimida, con las semillas dispuestas en una ventral. La dehiscencia ocurre en las suturas dorsal y ventral, separándose en dos valvas o mitades. Las vainas son de color verde al estado tierno y a la madurez se tornan de color negro y consistencia coriácea. Las vainas cuando están verdes, se las encuentra tapizadas interiormente de un tejido blando de color blanquecino y de consistencia aterciopelada (tejido esponjoso y parenquimatoso) que encierra de dos a diez semillas grandes o comprimidas de color y tamaño diferentes de acuerdo al cultivar. La disposición de los frutos varía, desde erguidos, formando un ángulo muy agudo con el tallo, hasta colgantes. La longitud

dimensional difiere de acuerdo a la variedad, pudiendo alcanzar desde cinco hasta treinta centímetros.

Semillas

Las semillas son de forma ovalada, de superficie lisa, opaca y brillante, de coloración muy variada que va desde colores oscuros hasta los claros, así el color puede ser negro, rojo, verde morado, pardo, grisáceo, blanco-cremoso o blanco; también pueden ser jaspeados o de dos colores. El tamaño de las semillas varia desde pequeño, con un largo de 1.6 cm en la subespecie *minor*, hasta semillas grandes, con un largo aproximado de 3.5 cm en la subespecie *major*. Exteriormente el tegumento presenta varias partes o apéndices que sirven para reconocer las especies, entre ellas está el hilio o cicatriz dejada en la semilla por la separación del funículo; que es opaco, ovalado o lineal y generalmente de color negro. El tegumento es impermeable (duro) y es un factor importante para la conservación de la vitalidad. Según MACA (2005), el haba se caracteriza por ser una planta de ciclo anual y de porte recto, que presenta:

1.4. Requerimientos climáticos

Aunque no es de las más exigentes prefiere temperaturas uniformes templado-cálidas y los climas marítimos mejor que los continentales. En climas fríos su siembra se realiza en primavera. Sus semillas no germinan por encima de 20 °C. Temperaturas superiores a los 30°C durante el periodo comprendido entre la floración y el cuajado de las vainas, puede provocar abortos tanto de flores como de vainas inmaduras, aumentando la fibrosidad de las mismas. Son muy sensibles a la falta de agua, especialmente desde la floración hasta el llenado de las vainas (MACA 2005).

Es poco exigente en suelo, aunque prefiere suelos arcillosos ricos en humus, profundos y frescos. Le perjudican los suelos húmedos mal drenados. El pH óptimo oscila entre 7,3 y 8,2. Es relativamente tolerante a la salinidad (Agrios, 1996)

1.5. Particularidades del cultivo

1.5.1. Preparación del terreno

Debido a que la planta posee una potente raíz pivotante, hay que realizar una labor profunda para acondicionar el terreno, de 25 a 40 cm de profundidad, aprovechando para la incorporación del abonado de fondo (Agrios, 1996).

1.5.2. Siembra

La época de siembra está ligada al clima y se realiza desde agosto-septiembre en cultivos precoces hasta noviembre y en las zonas de interior se ponen en primavera.

Las semillas se disponen en líneas o caballones, con una distancia entre líneas de 50-60 cm y 25-30 cm entre plantas. La nacencia se produce a los 8-12 días, dependiendo de la temperatura y la recolección se realiza transcurridos aproximadamente 90 días (según variedades) (Agrios, 1996).

1.5.3. Abonado

Además del aporte nitrogenado realizado por la bacteria simbiótica *Rhizobium leguminosarum*, que es variable dependiendo del suelo, clima, técnicas de cultivo y genotipo de la planta; pudiendo estimarse entre 59-126 Kg/Ha, es necesario un aporte de nitrógeno adicional para las primeras fases del cultivo, además de fósforo y potasio. Junto a las labores de preparación del terreno se aporta un abonado similar al siguiente (cantidades orientativas): estiércol (20 Tn), superfosfato de cal al 18% (500 kg), cloruro o sulfato de potasio (200 Kg), sulfato amónico al 21% (200 Kg) (Agrios, 1996).

1.6 Plagas y enfermedades

1.6.1 Plagas

1.6.1.1 Pulgón negro (*Aphis fabae*)

También conocido como el pulgón negro de las habas, es un insecto muy polífago, y ocasiona importantes daños directos e indirectos.

Esta plaga segrega una melaza que favorece la aparición de negrillas, interfiriendo en el normal desarrollo del cultivo, además de los daños directos causados por picaduras principalmente en las hojas.

Los adultos son de color negro mate o verde oliva, mide 1,5 a 3 mm y tienen las antenas cortas. Los inmaduros son verdes al principio para ir oscureciendo. Procedente del huevo de invierno, aparecen una o dos generaciones fundadoras en el hospedador. La emigración de los insectos alados se producen con unas condiciones óptimas de 26°C y 60% de humedad relativa (Agrios, 1996).

El control de esta plaga se realiza mediante la eliminación de malas hierbas y restos de cultivos anteriores, la colocación trampas cromotrópicas amarillas, la realización de tratamientos preventivos, antes de que la población alcance niveles altos. Las materias activas a emplear son: Deltametrin 2.5%, Deltametrin 2.5% + Heptenofos 40% (MACA 2005).

1.6.1.2 Sitona (*Sitona lineatus*)

Escarabajo que roe de una forma muy regular los bordes de las hojas, quedando éstas con un festoneado muy característico; estos daños son producidos por el adulto, pero también las larvas pueden destruir los nódulos de *Rhizobium*, reduciendo su capacidad fijadora de nitrógeno, con consecuencias directas sobre el crecimiento. Para su control se emplea: Triclorfon y Carbaril; pero también es factible la realización de aplicaciones de insecticidas granulados como Teflutrin 0.5%, a dosis de 20-25 Kg/Ha (MACA 2005).

1.6.2 Enfermedades

1.6.2.1 Roya (*Uromyces fabae*)

Atacan a la parte aérea de la planta, principalmente a las hojas y tallos. Las lesiones son generalmente locales en las que se rompe la epidermis y aparecen masas pulverulentas de esporas que dan aspecto de herrumbroso (Agrios 1996).

El control de esta enfermedad se realiza mediante: Ziram, Maneb, Triadimefon + Propineb, Mancoceb y Metiltiofanato.

1.6.2.2 Botrytis (*Botrytis fabae*)

La enfermedad se desarrolla en las hojas, aunque los tallos y flores también pueden ser infectados bajo condiciones favorables al hongo.

Sobre las hojas los síntomas varían desde pequeños puntos de color marrón-rojizo a manchas circulares con el margen marrón rojizo y el centro de color café claro. En condiciones óptimas de temperatura (18-20°C) y humedad (90-100%) la infección resulta muy agresiva (Agrios 1996)

El control de esta enfermedad se realiza empleando fungicidas tales como: Captan al 47.5%, Folpet 80% y Mancoceb 10 %.

CAPITULO II

EL HABA EN BOLIVIA

2.1 Origen

Según Piérola (1997), es una especie originaria del Medio Oriente o más específicamente de la Mesopotamia, con migraciones hacia la cuenca del Mediterráneo, Etiopia, India, Afganistán, China, Europa Central y Norte y migraciones tardías a América del Sur durante el siglo XVI, constituyéndose en un importante centro secundario de diversificación en los países Perú, Bolivia, Colombia, Ecuador y México.

2.2 Condiciones climáticas para el cultivo de haba.

El haba es una especie anual adaptada a climas fríos y templados con pluviosidades elevadas. En Bolivia, el haba se cultiva en una amplia gama de ambientes que oscilan desde los valles mesotérmicos (2000 msnm) hasta las mesetas alto andinas del altiplano (3800 msnm). La presencia de heladas cuando las plantas son muy pequeñas o están germinando, puede causar la muerte de los tejidos apicales, sin embargo tiene la capacidad de rebrotar y continuar con su desarrollo vegetativo (Crespo, 1996).

El cultivo de haba se desarrolla muy bien en climas templado - fríos, tolera heladas ligeras y requiere de una provisión permanente de humedad, aunque es ligeramente resistente a la falta de agua. Durante la floración requiere de al menos 10 °C de temperatura y un nivel de 25% de humedad aprovechable en el suelo para evitar la caída de las flores y vainas (MACA, 2005).

2.3 Importancia del haba en Bolivia

Esta especie, por su cualidad nutritiva del 25% de proteína y por el bajo costo de su grano, es de importancia para la alimentación humana, especialmente para la población que no cuenta con muchos recursos.

Además se destaca por su tolerancia a las bajas temperaturas de la zona andina y su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, esta última característica, contribuye a mejorar el suelo (Waaijenbergh, 2000).

En Bolivia, el haba es un cultivo importante en las cabeceras de valle y zonas altas (2.500 a 3.850 msnm). Es una fuente de proteína barata para la alimentación humana y su follaje sirve como forraje para la alimentación del ganado. Es una especie tolerante a heladas y sus raíces en simbiosis con bacterias, fijan y aportan al suelo cantidades importantes de nitrógeno atmosférico lo que permite ahorrar en el uso de fertilizantes químicos, es un componente importante de los sistemas de rotación (IBTA *et al.* 1996).

Según MACA (2005), el cultivo de haba tiene la siguiente composición bromatológica en base al grano seco (Tabla 1).

Tabla 1. Composición bromatológica en base a grano seco.

Especie	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasas (%)	Carbohidratos (%)	Calorías cal/Kg de alimento
Haba	11	23.4 – 25.9	24	55.3	11

Fuente: Ficha técnica MAGDER, Cultivo de haba 2002.

En la zona andina de Bolivia, el cultivo de haba es la más importante entre las leguminosas; esta importancia radica en diversos factores: Su rol en los sistemas productivos agrícolas (rotación, abono verde y fijador de nitrógeno); insumo alimenticio en ganado; fuente proteica en la alimentación de la familia productora; fuente de ingresos por su venta en mercados de consumo interno y externo de haba verde y seca (Balderrama *et al.* 2001).

Según INE (2004) se tiene el siguiente comportamiento en la superficie cultivada, producción y rendimiento en Bolivia (Tabla 2).

Tabla 2. Superficie cultivada, producción y rendimiento de haba en Bolivia

Año Agrícola	Superficie (Hectáreas)	Producción (Toneladas métricas)	Rendimiento (kilogramo/Hectárea)
---------------------	-----------------------------------	--	---

1999 – 2000	33805	65197	1929
2000 – 2001	33646	65846	1957
2001 – 2002	33190	59959	1807
2002 – 2003	33200	59231	1784
2003 – 2004	32484	59068	1788

Fuente: Ministerio de Agricultura y Ganadería - Elaboración: Muller Asociados

2.4 Importancia económica.

La importancia de la producción de haba en Bolivia, se explica esencialmente por su aporte económico, social y nutricional a nivel familiar y, sobre todo, contribución ambiental a las parcelas individuales de los agricultores. De hecho, el sector productivo de haba en nuestro país cuenta con solo una superficie de 30,558 hectáreas cultivadas en 6 departamentos del país (INE 2006), siendo Potosí y La Paz los de mayor extensión y, por tanto, de producción de haba fresca para el mercado local y haba seca para la exportación. Entre ambos departamentos se produce aproximadamente el 52% del haba fresca de Bolivia.

Las provincias que se distinguen por su producción y abastecimiento al mercado local y exportación son esencialmente las siguientes: Manco Kápac, Omasuyos, Camacho, Ingavi y Los Andes, todas circundantes al Lago Titicaca y con planicies propias del Altiplano boliviano que genera un entorno propicio para la producción en el departamento de La Paz. En el departamento de Potosí se distinguen una serie de zonas productoras en las provincias de José María Linares, Saavedra, Tomás Frías, Nor y Sur Chichas y parte de Chayanta. En su mayoría la producción esta resguardada en pequeños valles con micro climas específicos, lo que permite una producción menos vulnerable a variaciones abruptas del clima. Posiblemente la provincia de mayor producción en este momento se encuentre en José María Linares, concretamente en comunidad alrededor de Puna en pleno Altiplano Sur.

En síntesis, la cadena productiva del haba en Bolivia siembra no más de 31 mil hectáreas cada año obteniendo aproximadamente 55 mil TM de haba fresca, de las cuales se utiliza el 12,06% como semilla y alimento para ganado menor (esencialmente destinado a la avicultura). Asimismo, se destina 7.64% de la producción para derivados artesanales (todavía no existe derivados industriales importantes) y solo el 2.41% de la producción total se destina a la exportación (FAOSTAT 2007).

De acuerdo a las cifras oficiales registradas en el año 2006 y la utilización de las Hojas de Balance de Alimentos de la FAO de años precedentes, esto implicaría que aproximadamente 6,600 TM de haba fresca son usadas como semilla por los propios agricultores y/o campesinos, mientras que 4,184 TM de haba fresca se pela y transforma de manera artesanal obteniendo habas secas para *snack* (saladitas) y solo 2,320 TM de haba fresca (o su equivalente en haba seca) se exporta, quedando para el mercado domestico 41,667 TM de haba fresca para su consumo. Este aspecto se observa con más claridad en la gestión 2007, pues Bolivia exportó 1,4 millones de dólares con un volumen de 1,7 mil toneladas (25 % menos que la gestión anterior) y hasta septiembre de 2008 se exportó cerca a 579.000 dólares con un volumen de 602 toneladas.

Un servicio informativo del Mercado Común del Sur (Mercosur) indica que, tras una exploración inicial, Bolivia ha comenzado a incrementar la exportación de habas secas a diversos mercados, entre los que se cuentan Japón, España y Portugal, mientras crece la aceptación de este alimento rico en proteínas, hierro y fósforo.

2.5 Factores limitantes en la producción de haba

El Ministerio de Desarrollo Rural y Agrícola, ha detectado que el mercado internacional del haba se divide en dos grupos: el haba verde y el haba seca, siendo esta última el de mayor importancia.

El conjunto de países importadores de haba seca está comprendido por 80 países, de los cuales Japón, Portugal, Canadá, Francia, España y Colombia absorben el mayor volumen importado, que en promedio representa el 92,5 por ciento del total exportado.

Las exportaciones bolivianas de haba seca no llegan al 1 por ciento del tamaño del mercado internacional; esta realidad provoca un conjunto de interrogantes en busca del porqué de la causalidad.

La respuesta se encuentra en que la dimensión externa es el mayor tropiezo, pues los principales países clientes son muy exigentes especialmente en cuanto a calidad, sin olvidar que las variedades de haba cultivadas en Bolivia son las denominadas criollas, que se caracterizan por bajos rendimientos, por ser susceptibles de plagas y tener un largo ciclo productivo, en comparación a variedades mejoradas de alta productividad de países del medio

oriente.

2.6 Comercialización del haba

El expendio de este producto, puede realizarse de diferentes maneras, por un lado están los pequeños agricultores y/o campesinos, estos productores venden sus excedentes (después del autoconsumo) de manera individual a rescatadores que comercializan la leguminosa al mayoreo en los mercados de las principales ciudades capitales e intermedias del Altiplano, valles y llanos de nuestro país. Sin embargo, las prácticas de comercialización del haba pueden ser distintas. Por ejemplo, se cuenta con agricultores que directamente venden su producción excedentaria en ferias locales y mercados, con vainas o solo los granos, mientras que hay agricultores que clasifican la producción por calibre para obtener un mejor precio en el mercado,

2.7 Procesamiento agroindustrial

El haba es uno de los pocos productos que no cuenta con un procesamiento adecuado para su expendio, en el mercado informal este producto generalmente se presenta como: habas tostadas envasadas en bolsas para “snack” y como habas cosidas (mote), que son las presentaciones más comunes.

A pesar de que existen esfuerzos por abarcar un mercado más amplio de manera de mejorar la producción de haba, mediante la transformación de este producto, ya sea en harina de haba, puré, polvo para la elaboración de sopas e inclusive dulce o mermeladas (como se realiza en el exterior), aún es reducido su consumo, debido a que el aspecto y precio, cuenta para el consumidor que opta por productos convencionales alternativos.

En tal caso lo que se observa es una falta de apoyo por parte del sector gubernamental, hacia la producción agrícola, que llega coartar la producción de esta leguminosa a nivel del mercado interno.

CAPITULO III

Botrytis fabae – “MANCHA CHOCOLATE”

3.1 Síntomas

En las fases de desarrollo inicial del cultivo, la enfermedad se puede presentar en forma de manchas características de color chocolate sobre las hojas (fase no agresiva) (Figura 1.A), posteriormente alcanza a los tallos flores y vainas. En la fase agresiva de la enfermedad (floración, formación y maduración de vainas), las partes afectadas se ven como manchas necrosadas con abundante formación de una felpa de color gris marrón sobre la misma (Figura 1.B).



Fig. 1. Sintomatología de la mancha Chocolate

A. Síntomas iniciales de la mancha Chocolate, fase no agresiva. B. Infección del fruto ocasionado por *Botrytis fabae*. C. Vista Panorámica de cultivo de haba infectada por la mancha chocolate.

La defoliación de las hojas y flores, ocurre como consecuencia de la infección. En las vainas verdes, la pudrición de vaina, ocurre desde la punta hacia la base. Los granos secos, presentan manchas sobre el tegumento.

La pudrición en vainas por *B. fabae*, se presenta principalmente, en las vainas basales de la primera floración, que normalmente están entre la canopia, donde la humedad es mas alta, la pudrición comienza en la parte apical de la vaina y avanza conforme desarrolla la vaina, hasta necrosar completamente (Agrios, 1996).

En la parte apical toma una coloración marrón y se ve recubierta de una felpa gris, que son los conidióforos y conidias del hongo. En la zona de avance de la enfermedad se observa una formación lanosa de color blanquecino (micelio), que conforme se necrosa la vaina se forma esclerocios. Los granos son contaminados por el hongo y presentan manchas irregulares de color marrón en el tegumento del grano (Agrios, 1996).

3.2 Infestación

La infestación o inoculación es el proceso mediante el cual un patógeno y su hospedero entran en contacto. En el caso de *B. fabae* se produce cuando la conidia diseminada entra en contacto con el hospedero. También ocurre cuando una superficie infestada con micelio entra en contacto con un tejido sano (Agrios, 1996).

3.3 Penetración

La conidia, después de haber sido incubada unas horas bajo condiciones favorables a la germinación, se adhiere fuertemente a un sustrato vivo o descompuesto mediante la producción de secreciones (Doss *et al.*, 1995). Una vez adherida penetra directamente al perforar mecánica y/o enzimáticamente la cutícula e indirectamente por heridas o por aberturas naturales, 1986).

La penetración mecánica de *B. fabae* se realiza través del apresorio que nace del extremo distal de la conidia germinada. De este apresorio surge el estilete de infección, el cual penetra directamente la cutícula hasta las células epidermales (Auger, 1988).

La penetración enzimática de la cutícula, se produce gracias a la producción de enzimas como

celulasas, pectinasas y pollgalacturonasas (Verhoeff, 1974). Además, el patógeno produce ácido oxálico que acidifica el tejido de la planta para facilitar la hidrólisis de la pared celular (Van Baarlen *et al.*, 2004).

Durante la penetración, en las células del tejido de la hoja se produce peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, que permiten el ingreso del tubo de germinación de las conidias (Van Baarlen, *et al.*, 2004). Sin embargo, este proceso de infección se bloquea durante la penetración de la pared celular, debido a que la planta es capaz de generar una respuesta en defensa al ataque de este patógeno (Hsieh, *et al.*, 2001).

3.4 Infección

La enfermedad puede manifestarse en forma sintomática o latente. La infección sintomática corresponde a la infección común, en la cual el patógeno ha penetrado directamente o por heridas. La Torre (1986) señala que si las condiciones son óptimas, la incubación ocurre en pocas horas y rápidamente se producen reinfecciones, debido a las conidias producidas luego del desarrollo de los primeros síntomas de *Botrytis*.

3.5 Resistencia a la enfermedad

Un estudio realizado en liliun, demostró que al inocular flores con conidias de *Botrytis*, se origina una secreción de fitotoxinas que logran bloquear la infección en el interior del ovario, al crear deficientes condiciones para el desarrollo del hongo. Se observó un aumento de la acción de la peroxidasa cerca del crecimiento del micelio, además de un incremento de la concentración alrededor en las paredes celulares. La peroxidasa actúa lignificando la pared celular lo que provocaría una mayor resistencia a la infección (Georgieva, *et al.*, 2003).

Esta respuesta defensiva no es propia de liliun. En estudios realizados en tomate se comprobó la presencia de un aumento de la peroxidasa frente al ataque de *Botrytis fabae*. Este efecto es una respuesta frente a la presencia de hongos, bacterias y virus (Georgieva *et al.*, 2003)

3.6 Dispersión

En clima húmedo, el hongo libera fácilmente sus conidias y éstas son diseminadas por el viento (Agrios, 1996). Según La Torre (1986) la lluvia, por el fenómeno de salpicado, tiene también importancia en la liberación y diseminación de conidias. Al interior de un invernadero, las

conidias son liberadas al ambiente por un mecanismo higroscópico asociado a un cambio rápido en la humedad relativa (Daughtrey & Benson 2005). Miller (1992) señala que es fundamental el manejo de los desechos del cultivo, ya que ellos provocan una dispersión de esporas si no son tratados adecuadamente.

3.7 Sobrevivencia

B. fabae puede sobrevivir como saprófito en un gran número de plantas cultivadas y malezas, o en materias en descomposición (Auger, 1988). Las conidias pueden sobrevivir por más de 14 meses en almacenamiento, aunque disminuye su viabilidad. (Salinas *et al.*, 1989). Sin embargo, sobre la tierra no son capaces de lograrlo. En el suelo el hongo inverna en forma de esclerocios producidos sobre restos orgánicos dejados luego de cosechar las flores, o de micelio que se desarrolla en restos de plantas en proceso de descomposición (Berg & Lentz, 1968).

3.8 Fuente de inóculo

Daughtrey & Benson (2005), descubrieron que los esclerocios pueden sobrevivir bastante tiempo y ser útiles como fuente de inóculo para la siguiente estación. El tiempo que pueden sobrevivir fluctúa entre cinco y nueve meses. Prácticas de control de malezas tanto químicas como mecánicas no tienen efecto en su sobrevivencia.

3.9 Efecto de los factores ambientales

Para que una enfermedad se produzca y se desarrolle óptimamente, debe haber una combinación de tres factores: hospedero susceptible, patógeno infectante y un medio ambiente favorable (agrios, 1996).

3.9.1 Temperatura de crecimiento

Jarvis (1977) encontró que la temperatura óptima de crecimiento de micelio de *Botrytis fabae* en medio PDA es de 22°C. En condiciones ambientales controladas, no se detectó producción de micelio aéreo ni de conidias a temperaturas de 30°C. El micelio requiere de un clima húmedo y moderadamente frío (18 a 23°C) para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germine sus esporas y para que produzca infección (Daughtrey & Benson, 2005).

3.9.2 Temperatura de esporulación

Existen diferencias notables de acuerdo al hospedero del cual se obtiene la cepa. Thomas, Marios (1988), estudiando cepas del patógeno obtenidas de uva; señala que la mayor producción de conidias bajo condiciones ambientales controladas se logró a 21°C. Sin embargo, Jarvis (1977), definió que, la temperatura óptima para la esporulación es de 15°C.

3.9.3 Temperatura de germinación e infección

Según LaTorre & Rioja (2002) la germinación de conidias ocurre en un amplio rango de temperaturas (5° a 30°C), con un óptimo de 20°C. La infección puede ocurrir a bajas temperaturas cuando las plantas permanecen mojadas por largos períodos de tiempo (Ries, 1995). Jarvis (1992) señala que la temperatura óptima de germinación de esporas es de 20°C y la temperatura óptima de crecimiento del tubo germinativo es de 30°C.

3.9.4 Temperatura para la formación de esclerocios.

De acuerdo con Jarvis (1992) los esclerocios se forman en otoño – invierno, cuando las temperaturas fluctúan entre 11° y 13°C y germinan con temperaturas de 22° a 24°C.

3.9.5 Humedad

El efecto más importante de la humedad ocurre sobre la germinación de las conidias de los hongos y sobre la penetración del tubo germinativo en el hospedero. También influye al incrementar la succulencia del hospedero, aumentando así su susceptibilidad a ciertos patógenos (Agrios, 1996).

La humedad relativa necesaria para que ocurra infección es mayor al 90%, que provoca condensaciones, producto de la evapotranspiración, difíciles de medir, pero suficientes para iniciar la germinación e infectar al hospedero. Los eventos de infección en el campo se inician en respuesta a lluvias, lloviznas o presencia de neblinas que condensan sobre el órgano afectado (LaTorre & Rioja, 2002).

3.10 Características morfológicas

Entre las características objetivas para distinguir a *B.fabae* de otras especies de *Botrytis* están:

el crecimiento y forma del micelio, el tamaño y color del conidióforo, la forma, tamaño y color de las conidias, y tamaño del esclerocio.

3.10.1 Micelio y estructuras reproductivas asexuales

Las colonias al principio son hialinas, luego se tornan gris a café grisáceo con el desarrollo de las conidias (CMI, 1974). Las hifas son septadas y ramificadas (Jarvis, 1977).

Los conidióforos son erguidos, simples o ramificados (Alexopolus, 1966). Miden 750 μm hasta 2 mm de longitud y 16-30 μm de ancho, tienen una protuberancia apical con ramificaciones alternas. Presentan color café oscuro y tienen la pared lisa (CMI, 1974). En las células apicales se producen racimos de conidias unicelulares (CMI, 1974).

Los conidióforos y los racimos de conidias se asemejan a un racimo de uvas (Agrios, 1996). En la superficie de las hojas infectadas se elevan uno a dos mm. Las conidias son ovales o esféricas, hialinas o de color café pálido, hidrófobas, de pared lisa y miden entre 8-14 μm de largo y 6-9 μm de ancho (CMI, 1974, Hsiang y Chastagner, 1991).

3.10.2 Esclerocios

Este hongo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro (AGRIOS, 1996). Según Hsiang & Chastagner (1992) el tamaño varía entre 3,5 y 5 mm. Éstos consisten en una médula densamente empaquetada con un pseudoparénquima color café a negro y una capa cortical de células de 5-10 μm de diámetro. La parte externa está compuesta por una malla de hifas entramadas uniéndose en un cuerpo compacto que va madurando por la acumulación de pigmentos de melanina.

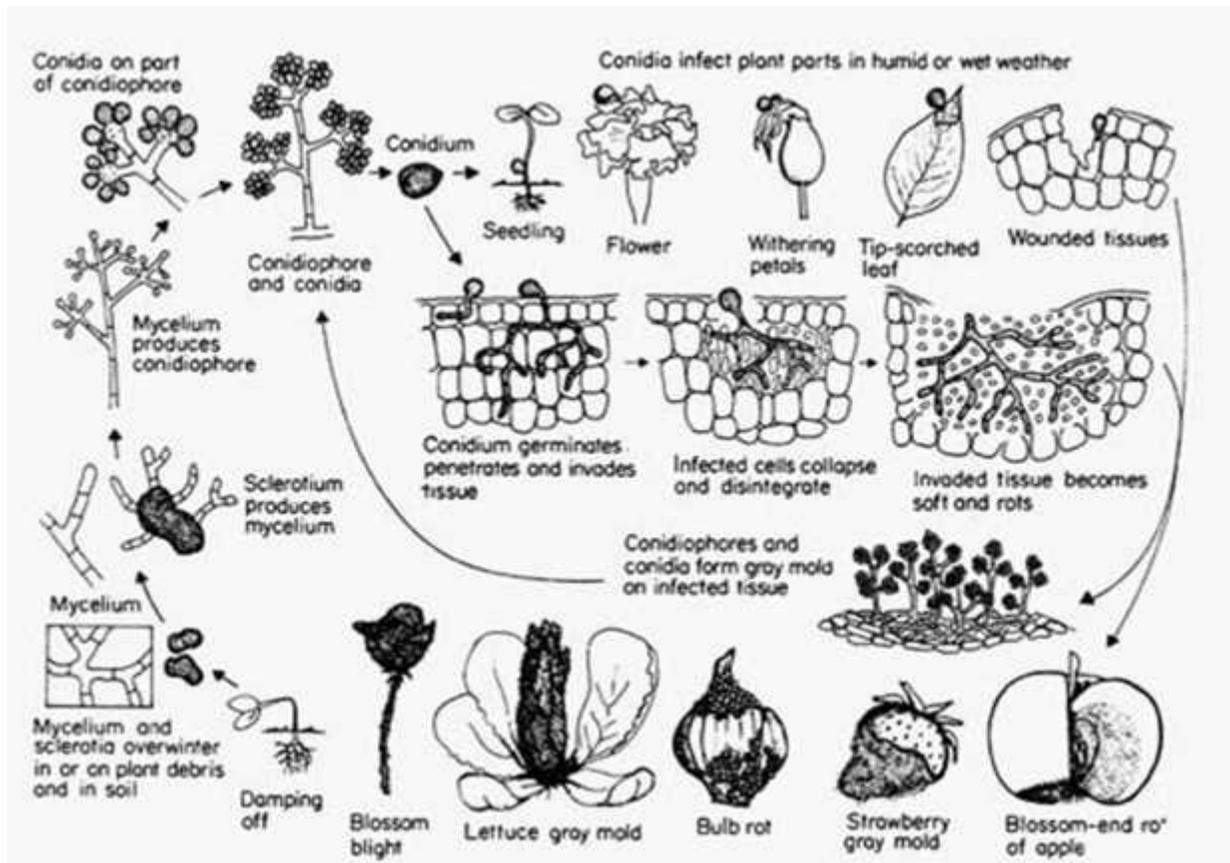


Figura 2. Ciclo evolutivo del desarrollo de infección de *Botrytis* spp, CMI, 1990.

CAPITULO IV

UNA NUEVA MANERA DE APROVECHAR LOS MICROORGANISMOS, EL CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES MEDIANTE *Trichoderma* spp.

4.1 Definición

El control biológico se define como, cualquier condición o practica por medio la cual la sobrevivencia o actividad de un patógeno se reduzca a través de la mediación de cualquier otro organismo, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad (Garrett, 1965).

4.2 *Trichoderma* spp.

El control biológico involucra el uso de organismos beneficiosos, sus productos, como metabolitos secundarios, reduce los efectos patogénicos de fitopatògenos en plantas y promueve una respuesta favorable por parte de esta. *Trichoderma* spp., ha sido usado ampliamente como un agente antagónico controlador, contra varias enfermedades.

4.2.1 Características de *Trichoderma*

Trichoderma es un género de hongo con característica asexual, se encuentra en todo tipo de suelos y zonas climáticas. *Trichoderma* es un invasor oportuno secundario, este hongo se caracteriza por presentar esporas resistentes, generadoras de enzimas hidrolíticas (celulasas, quitinasas, glucanasas, etc), y también es productor metabolitos con capacidad antibiótica, cualidad que hace a este hongo ideal para el control de enfermedades (Harman el al., 2004). Otro mecanismo por el cual este hongo tiene capacidad controladora es por su capacidad de confrontación directa con patógenos y lograr en estos el micoparasitismo (Howell, 2003) y antibiosis (Sivasithamparam y Ghisalberti, 1998).

4.2.1.1 Micoparasitismo y enzimas líticas

El micoparasitismo es un proceso complejo, que consta de varios eventos, organizados de la siguiente manera: reconocimiento del patógeno, ataque, penetración y subsecuente muerte del patógeno.

Durante este proceso *Trichoderma* secreta enzimas hidrolíticas, que hidrolizan la pared celular del hongo patógeno, desnaturalizando de esta manera la pared del hongo (Kubicek et al., 2001; Corteje et al., 2006). Se cree que *Trichoderma* secreta las enzimas hidrolíticas cuando este detecta la presencia de otro hongo en su medio, y se produce el fenómeno de respuesta enzimática (figura 3) (Corteje & Lorito, 2007).

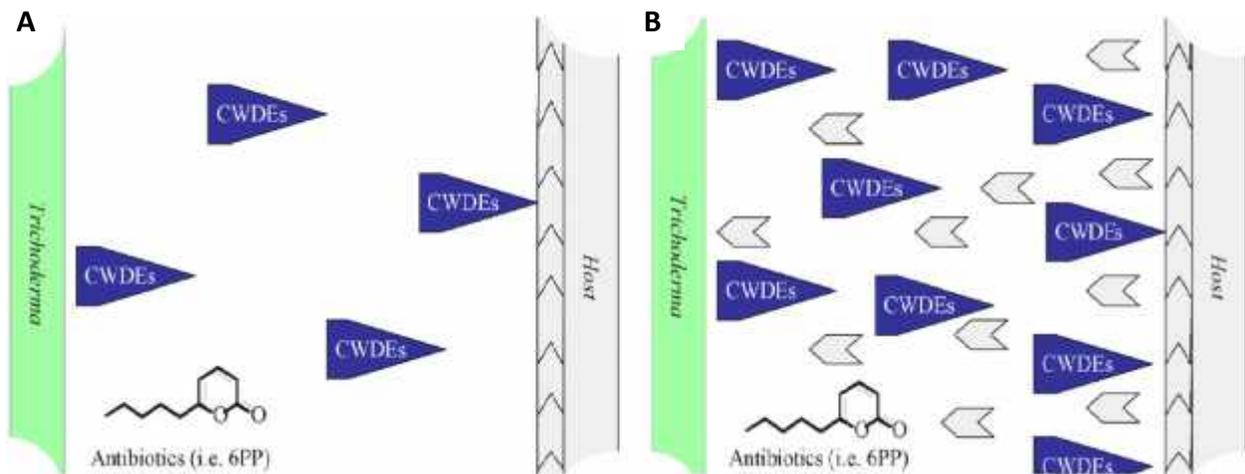


Figura 3. Eventos de interacción de *Trichoderma* patógeno A: Se inicia la producción de enzimas por parte de *Trichoderma* conjuntamente con metabolitos volátiles. B: productos de enzimáticos degradan la pared celular y se activa el proceso de micoparasitismo (2007).

4.2.1.2 Antibiosis y metabolitos secundarios

Trichoderma produce una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica (Sivasithamparam & Ghisalberti, 1998). El término “metabolito secundario” incluye un heterogéneo grupo de compuestos químicamente diferente. Se incluyen en este grupo los antibióticos que son los productos naturales capaces inhibir el crecimiento microbiano. La producción antibiótica es a menudo correlacionada con el biocontrol. Ghisalberti et al., (1990) demostró la eficacia del biocontrol de *Trichoderma harzianum* contra *Gaeumannomyces graminis*, este efecto se relacionó con la producción de piranos. Ghisalberti y Sivasithamparam

(1991) clasificaron a los metabolitos secundarios en tres categorías: (1) metabolitos volátiles como el 6 – fenilpirano; (2) los compuestos solubles en agua, como el ácido del heptelidico o ácido del koningico; (3) El peptaibol el cual es un oligopéptido lineal de 12–22 aminoácidos.

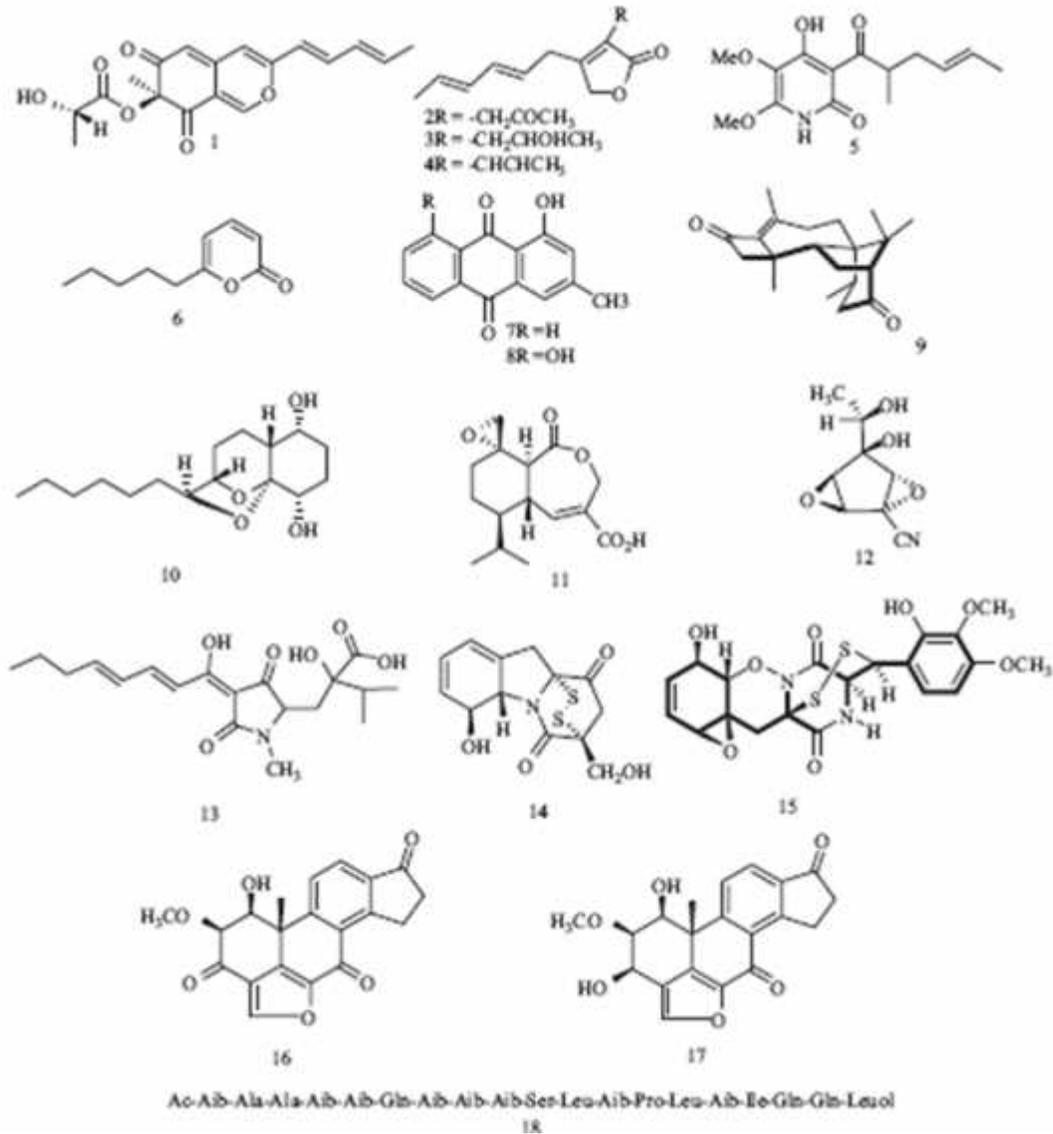


Figura 4. Estructuras químicas de metabolitos secundarios aisladas a partir de *Trichoderma spp* 1: T22azafilona; 2: T39butenolida; 3: harzianolida; 4: dehidroharzianolida; 5: harzianopiridina; 6: 6-pentyl- -pirano; 7: 1-hidroxi-3-metil-antraquinona; 8: 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona; 9: harziandiona; 10: koninginina A; 11: ácido heptedelico; 12: trichoviridina; 13: ácido harcianico; 14: gliotoxina; 15: gliovirina; 16: viridina; 17: viridiola; 18: trichorzianina, (1991).

4.4 Trichoderma planta – patógeno

Además de los efectos beneficiosos que ocurren en las interacciones con agentes patógenos, algunas especies de *Trichoderma*, también pueden colonizar la superficie de la raíz y esta causa cambios sustanciales en el metabolismo de la planta. Se estableció también que algunas de estas interacciones sobre la planta, incrementa el crecimiento, aumento la disponibilidad nutriente, mejora la cosecha la producción y refuerza la resistencia a la enfermedad (Harman et al., 2004).

4.3 Caracterización filogenética de la cepa *Trichoderma spp* BOL 12 – QD.

El análisis genético realizado, mediante la comparación con datos del GenBank, estableció que la cepa *Trichoderma spp* BOL 12 QD, presento un 99 % de homología con la secuencia de *Trichoderma inhamatum*.

Súper – Reino:	Eucariota
Reino:	Fungí
Filo:	Asomycota
Orden:	Hypocreales
Familia:	Hypocreaceae
Genero:	Hypocrea
Especie:	<i>Hypocrea inhamatum</i>
Nombre:	<i>Trichoderma inhamatum</i>

CAPITULO V

ASPECTOS INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO SECUNDARIO

5.1 Regulación del metabolismo secundario en hongos

Los metabolitos secundarios, son estructuralmente compuestos químicos diversos y raros, generalmente son producidos conjuntamente como una variada mezcla de estructuras químicas y normalmente se forma en proporciones muy bajas.

En el metabolismo secundario es donde se forman los metabolitos secundarios, estas moléculas poseen estructuras químicas complejas y no son participes en el crecimiento del organismo productor. Los metabolitos secundarios, solo son producidos por algunas especies de microorganismos. Estos metabolitos se caracterizan por presentar en su estructura uniones químicas, como los anillos: lactámicos y péptido cíclicos. Se producen metabolitos secundarios típicamente como los miembros de una familia química particular debido a especificidad baja de algunas enzimas involucradas en el metabolismo secundario. Entre ellas tenemos las: micotoxinas, antibióticos, los pigmentos y feromonas. Una característica importante del metabolismo secundario es que normalmente se suprime por el crecimiento de la biomasa del organismo. Además del crecimiento, las vías de síntesis, son a menudo afectadas por los mecanismos reguladores como la inducción, la represión, el nutriente, enzimas sintetizadas que determinan la regulación del producto.

5.2 Formación de metabolitos en cultivos de batch

En cultivos en batch el medio se mantiene rico nutritivamente, los niveles altos de metabolitos secundarios normalmente sólo se producen después que exista un aumento de la biomasa, es decir incremento en el crecimiento celular. La fase en la que existe este crecimiento celular se denomina "trofofase" y se considera que la fase de la producción de metabolitos secundarios es la "idiofase."

En las fermentaciones para la obtención de metabolitos secundarios, la dinámica de la trofofase e idiofase se articulan, ocurren una serie de mecanismos complejos de comunicación capaz de acelerar el crecimiento, pero las dos fases siempre coadyuvan tanto en el crecimiento

como en la producción.

El cronometrado de formación del producto no debe usarse para definir el metabolismo secundario. Tanto la trofofase e idiofase, ocurren con suerte en dos momentos separados en el cultivo en batch, pero ambos a menudo se solapan. Un metabolito secundario, sólo es secundario porque no es innecesario para el crecimiento del productor (GrootWassink & Gaucher, 1980).

La expresión de los genes que normalmente codifican la biosíntesis del metabolito no ocurre a proporciones de crecimiento altas. El fenómeno sugiere que se reprimen las sintetisas del metabolito durante el crecimiento. De hecho, investigadores que han supervisado síntesis de sintetisas en el metabolismo secundario, han observado la formación de enzimas involucradas en su síntesis, de manera muy tardía, debido a que existe una represión durante la fase del crecimiento. Un ejemplo claro de que la actividad enzimática sólo aparece en el idiofase, es la aciltransferasa en la penicilina, que se activa para biosíntesis de la penicilina en el *Penicillium chrysogenum* (Luckner et al., 1977).

5.3 Factores reguladores de la síntesis de metabolitos

5.3.1 Regulación de fuente de carbono

La glucosa, normalmente una fuente del carbono excelente para el crecimiento, interfiere con la biosíntesis de muchos metabolitos secundarios. Los polisacáridos, oligosacáridos, y aceites son también a menudo buenas fuentes del carbono. Un medio de cultivo que contenga una fuente de carbono rápidamente usable como la glucosa y una que pueda ser usada lentamente, son ideales en la producción de metabolitos secundarios, pues la fuente de carbono rápidamente usable inicia el crecimiento del microorganismo, en cambio la que se asimila lentamente esta muy relacionado con la biosíntesis del metabolito secundario. La regulación de la fuente de carbono en el metabolismo secundario, es muy importante en muchas fermentaciones. Uno de estos casos se presenta en el hongo *Penicillium*, pues al emplear glucosa como fuente de carbono existe una inhibición en la producción de penicilina. En este caso la glucosa reprime la formación del triplete ácido L - aminoadipico, L - valina y L - cisteina (Martin and Aharonowitz., 1982).

La formación de cefalosporina por *Cefalosporum acremonium*, tarda a menudo, hasta que el azúcar rápidamente utilizable (glucosa) sea consumido y el azúcar lentamente asimilable (sacarosa) empiece ser usado. En comparaciones de fuentes del carbono individuales, se

encontró que las fuentes de carbono más rápidamente utilizables para este hongo como la glucosa, glicerol y maltosa, rinden menos cantidad de antibióticos, que cuando se utiliza azúcares de lenta asimilación como: la sacarosa y galactosa. Cuando se comparan concentraciones diferentes de glucosa, la producción antibiótica ocurre mejor a una concentración baja de glucosa (Behmer & Demain, 1983).

5.3.2 Represión de fuente de nitrógeno

El nitrógeno es usado como regulador de la expresión de ciertos compuestos químicos en las levaduras. El amoníaco (o alguna otra fuente de nitrógeno) reprime enzimas involucradas en el uso de fuentes de nitrógeno como: la reductasa de nitrito y nitrato, deshidrogenasa de glutamato, arginasa, proteasa extracelular y acetamidasa. La producción del metabolito secundario es afectada por el amoníaco (Ward & Packter, 1974). Por ejemplo, en la producción de metabolitos secundarios derivados del acetato fenólico, como el trihidroxitolueno producido por *Aspergillus fumigatus*, está bajo la regulación del nitrógeno (Ward & Packter, 1974). Estos compuestos, sólo inician su síntesis en los cultivos en batch, cuando el nitrógeno del medio se agota. La suma de amoníaco inhibe su producción completamente.

Otro claro ejemplo se observa en la formación de bikaverina por el *Gibberella fujikuroi*, también está bajo la regulación de nitrógeno (Bu'Lock & Detroy 1974). Aquí se usa la glicina como la fuente de nitrógeno para la fermentación, pero la producción de la bikaverina sólo inicia cuando la glicina se agota.

Sánchez et al. (1981) estudió la regulación del nitrógeno en la formación de penicilina por *P. chrysogenum*. Y reportó que, existe una interrupción en la síntesis de esta, a una concentración de 85 mM de Nitrógeno.

5.3.3 Regulación de fosfato

El fosfato es un factor de crecimiento crucial como nutriente en muchas fermentaciones de metabolitos secundarios. El fosfato en el rango de 30 – 300 mM, generalmente apoya el crecimiento celular extenso, pero concentraciones de 10 mM, suprime la biosíntesis de muchos metabolitos secundario (Doxtader et al., 1966).

5.3.4 Índice de crecimiento

El mecanismo por el que la producción de metabolitos secundarios frecuentemente tarda hasta el inicio de la trofofase, involucra la represión de enzimas del metabolismo secundario durante el crecimiento por las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Sin embargo, también parece estar involucrada la velocidad de crecimiento.

En cultivos en batch de *C. fujikuroi*, primero ocurre el crecimiento (crecimiento a las 18 hrs), entonces la bikaverina se sintetiza (a 40h) y finalmente la gibberellina es sintetizada (70h) (Bu'Lock et al., 1974).

5.3.5 Interrupción de la biosíntesis

Existen dos razones conocidas para la cesación de biosíntesis de metabolitos secundarios:

1. Ausencia de una o más enzimas involucradas en la síntesis del metabolito.
2. Efecto de la regulación mediada por el producto acumulado en el medio

5.3.5.1 Carencia de Enzimas Sintetasas.

En muchos casos la producción de metabolitos secundarios, involucra la ausencia de las enzimas que participan en la síntesis. En la producción de patulina por *P. urticae*, cuando existe una ausencia o disminución de la enzima, ácido 6 - metilsalicílico sintetasa, que tiene una vida media máxima de siete horas (Murile & Olmedo, 1976), existe una depresión en su producción.

5.3.5.2 Autorregulación

El papel de autorregulación, controlada por los metabolitos secundarios, es otro mecanismo que suspende la síntesis del mismo. Muchos de los metabolitos secundarios inhiben o reprimen su propia biosíntesis al encontrarse en concentraciones elevadas en el medio. Por ejemplo, el ácido micofenólico limita su propia síntesis, inhibiendo a la enzima que participa en su síntesis la O - metiltransferasa, en el *Penicillium stoloniferum*. No obstante existen otros mecanismos de autorregulación, tales el caso en *Phycomyces blakesleeanus*, la cual es productora de β - carotenos, cuando esta se detecta en concentraciones elevadas la misma activa al gen car5 que reprime su producción. (Murile & Olmedo, 1976).

5.4 Otros factores

5.4.1 Metales.

En la fermentación de aflatoxinas, el zinc se necesita a una concentración mayor que la que es requerida para un crecimiento y así conseguir una producción alta de micotoxinas (Gupta et al., 2003). Otros investigadores han reportado efectos de estimuladores por cadmio, manganeso, cobalto, boro, molibdeno, cobre, hierro y calcio (Maggon et al., 1999) pero estas demandas tienen que ser cuidadosamente evaluadas para efectos de crecimiento. El exceso de manganeso es necesario para la producción de patulina (Maggon et al., 1999). El sitio de acción del manganeso parece estar subsecuentemente después del ácido 6 – metilsalicílico y cuando existe un acumulo mayor de este metal la producción es óptima.

5.4.2 Oxígeno

Los niveles altos de oxígeno que se administran a un medio de cultivo favorecen a una buena aceleración en el tiempo de crecimiento, y en la producción de enzimas. También produce un efecto inhibitorio en la fermentación de aflatoxinas. (Shih and Marth, 2000).

5.4.3 Luz

En algunos casos existe controversia considerable cuando lo que se menciona acerca del posible efecto negativo de la luz, debido a que esta estimularía la formación de aflatoxinas (Bennet et al., 1981). Pero por otro lado, la luz estimula la formación de las eniatinas por *Fusarium sambucinum*.

5.4.5 Temperatura

La temperatura es otro factor que no solo influye en el crecimiento, sino que también en la producción de metabolitos secundarios, para un crecimiento óptimo de *F. Sambucinum* la temperatura debe oscilar entre 4 °C a 11 °C estimulando así la producción de eniatinas (Audhya & Russell 1974) En contra parte también existen microorganismos que requieren de temperaturas ascendentes como *P. blakesleeanus* que para la producción de aflatoxinas, necesita temperaturas ascendentes por lapsos de tiempo determinados, este fenómeno parece acelerar notablemente la fermentación en substrato sólido (West et al., 1973).

CAPITULO VI

JUSTIFICACIÓN

El haba (*Vicia faba*) se constituyen en uno de los cultivos de importancia económica para Bolivia y una de las fuentes principales tanto de alimentación como de comercio, de la población andina rural. Se estima que la superficie cultivada a nivel nacional esta cerca de 31000 Ha (anual), dedicándose a este cultivo unas 200.000 familias o unidades productivas, según el Instituto Nacional de Estadística (INE).

Aunque el consumo en la región altiplánica, anualmente supera las 35.000 TM, su exportación en la gestión 2006 originó un ingreso 848.268 dólares, teniendo como destinos principales: Italia, Estados Unidos, Japón, Portugal y Francia según el Instituto Boliviano de Comercio Exterior (IBCE), por lo que se abren nuevas expectativas para incrementar la producción de esta oleaginosa, y de implícita manera este factor aportaría en el desarrollo de la zona altiplánica.

Por todo anterior citado, podríamos observar a la producción de haba como un negocio bastante rentable, y en cierta medida si lo es, pero, existen limitantes en su cultivo, tal es el caso de las enfermedades fitopatògenas, que limitan su producción

Uno de estos fitopatògenos, es *Botrytis fabae*, hongo característico en la patogenia del haba que produce la mancha chocolate, este patògeno puede reducir hasta dos tercios los

rendimientos del cultivo; Esta enfermedad se desarrolla rápidamente bajo condiciones de humedad y temperaturas comprendidas entre 15 y 22°C. No obstante para el control de esta enfermedad existen diferentes tipos de tratamientos mediante agroquímicos tales como: Mancozeb, Folpet, Selix. Benomyl, etc, que son usados frecuentemente.

Las nuevas políticas de salubridad, han limitado ya el uso de alguno de estos agentes químicos en la producción agrícola, puesto que no solo ocasionan un control de la enfermedad, sino que también son precursores del deterioro del medio ambiente (alteraciones en aire, tierra, agua y animales), en la salud tanto del productor como del consumidor y ocasionando la fungoresistencia.

Si consideramos las normas vigentes de exportación y el uso indiscriminado de agroquímicos (pesticidas, fertilizantes) que contribuyen a la acumulación de residuos tóxicos en los alimentos y en el ambiente, poco a poco se estaría coartando la exportación de este producto, y se originaría un fracaso económico, no solo para el agricultor, sino que también para mercado nacional.

Por todo lo anterior citado observamos la necesidad de contar con un producto que proporcione un control efectivo, no tóxico para la salud y el medio ambiente, una de estas alternativas nace en la utilización de microorganismos tales como bacterias u hongos, pero aunque exista una innumerable variedad de estos microorganismos, solo unos pocos poseen actividad controladora.

Uno de estos microorganismos es *Trichoderma spp.* caracterizado por presentar actividad controladora contra diferentes enfermedades, en este sentido, el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B), viene trabajando hace mas de 6 años con la cepa de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12 – QD, la cual presenta antecedentes de biocontrol de enfermedades, en cultivos agrícolas de importancia económica, tales como: tomate, cacao, papa y haba.

CAPITULO VII

OBJETIVOS

1. Objetivo General

- Evaluar la actividad del hongo biocontrolador *Trichoderma inhamatum* cepa BOL – 12 QD, frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*).

2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la luz sobre la producción de metabolitos secundarios con actividad controladora de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, mediante filtros.
- Establecer si los factores físicos de aeración y agitación del medio de cultivo en batch de *T. inhamatum* BOL 12 QD, influyen en la actividad controladora y la producción de enzimas hidrolíticas.
- Evaluar si la adición de nitrato de amonio sobre el medio de cultivo de *T. inhamatum* influye en la producción de metabolitos secundarios.
- Evaluar si el efecto de: fuente de carbono, temperatura y pH, influyen en la producción de metabolitos activos de *T. inhamatum* BOL 12 QD.
- Determinar si el co- cultivo de *B. fabae*, mediante biomasa y esporas, influye en la producción de metabolitos activos de *T. inhamatum* BOL 12 QD.
- Evaluar la actividad enzimática de los hongos *T. inhamatum* BOL12 QD y *B. fabae*.
- Determinar el efecto in vivo, sobre plántulas de haba, del fermento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, evaluando las variables de: Altura de la plántula, peso de plántula, número de vainas, longitud de vainas, peso de vainas, número grano verde por plántula, peso del grano verde por plántula, peso grano seco por plántula y severidad de la infección.

CAPITULO VIII

MATERIALES Y METODOS

8.1 Hongo Patógeno

8.1.1 Procedencia del patógeno *B. fabae*

El aislamiento del hongo patógeno, se realizó a partir de hojas de haba infectadas con *Botrytis fabae* (mancha chocolate), en parcelas de cultivo en la Comunidad Chua Cocani.

8.1.2 Aislamiento *B. fabae*.

La asepsia de las hojas se realizó sometiéndolas a una solución de etanol al 70% por 30 segundos, trasvasándolas luego en agua estéril por 20 segundos, secando las mismas sobre papel filtro. (Procedimiento realizado en campana de flujo laminar).

Una vez seca la hoja, se realizó cortes de diferentes tamaños con bisturí de las secciones que presentaban la enfermedad, que posteriormente fueron sembrados en cajas Petri con medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (PDA) (composición Anexo 1) y medio agar sabraud (especifico para hongos) incubándolos posteriormente a 22 °C.

8.1.3 Reproducción del efecto patógeno en plantas (postulados de Koch)

Este procedimiento se realizó sobre hojas sanas de haba, realizando la respectiva asepsia y secado de las mismas, un vez secas, se colocó las hojas de haba tanto de haz y del envés en caja Petri (que contenía en su base algodón y papel filtro humedecida con agua estéril), Luego se procedió a lesionar mediante cortes con bisturí las hojas de haba (aproximadamente 5 mm), al grupo de prueba se inoculó 20 µL de una suspensión de esporas del patógeno, a una concentración de 10^6 prop./mL (Calculado en cámara de Neubauer, en cuadrante de glóbulos blancos), del mismo modo se inoculó 20 µL de agua estéril al grupo control.

Se colocó dos hojas por caja Petri, tanto en el grupo control como en el de prueba, estas pruebas se realizaron por triplicado.

Una vez se observó el signo de enfermedad sobre las hojas de haba se procedió nuevamente a aislar al hongo patógeno, en medio de cultivo PDA.

8.1.4 Identificación del hongo patógeno.

Se realizó, tomando una muestra de la superficie de la caja Petri donde se aisló al patógeno, mediante un fragmento de cinta adhesiva transparente, posteriormente se la colocó sobre un portaobjeto, el cual contaba con una gota de azul de metileno y se observó al microscopio. No obstante en el proceso de identificación se tomó en cuenta la observación de las características morfológicas del hongo.

8.2. Hongos biocontroladores.

8.2.1 Procedencia del hongo biocontrolador.

Las cepas de hongos utilizadas en el presente trabajo fueron: BOL – 12 QD y BOL – 162 QD, procedentes del cepario del IIFB.

8.2.2 Activación de las cepas de estudio.

Las cepas BOL – 12 QD y BOL – 162 QD, estaban activadas, por lo cual se procedió a replicar las mismas en medio de cultivo PDA.

8.3 Evaluación de la Actividad biocontroladora.

8.3.1 Prueba de interacción patógeno – antagonista.

Se sembró en placa Petri sobre medio de cultivo PDA, un disco de micelio de 5 mm de diámetro (obtenida mediante sacabocado) del patógeno diametralmente opuesto a uno del antagonista, considerándose tres repeticiones por prueba, con un total de dos tratamientos, en la cual el solapamiento del hongo biocontrolador sobre el hongo patógeno se tomó como resultado positivo de inhibición.

8.3.2 Prueba de Cinética de Crecimiento

Se empleó, cajas Petri de 25 cm de diámetro, en las que se alícuotaron 100 mL de medio cultivo PDA, una vez agarizado, se procedió mediante sacabocado a extraer un disco 5 mm de agar de la parte central, posteriormente se inoculó 20 μ L de una suspensión de esporas de 10^6 prop/mL del hongo antagonista como del hongo patógeno en diferentes cajas respectivamente, considerándose tres repeticiones por prueba. El diámetro de crecimiento de la colonia se evaluó cada 24 horas, hasta que el crecimiento del hongo cubra totalmente la superficie de la caja.

8.4 Producción de metabolitos secundarios antagonistas

Se evaluó, aspectos físicos, químicos y biológicos.

8.4.1 Parámetros Físicos

8.4.1.1 Evaluación del efecto de luz sobre *T. inhamatum* cepa BOL – 12 QD

La evaluación de la influencia de luz en la producción de metabolitos secundarios se realizó empleando medio de cultivo Caldo Patata Dextrosa PDC (composición Anexo 2).

En este procedimiento se empleó botellas de vidrio de 100 mL a las cuales se alícuotó un volumen de 50 mL de caldo de cultivo PDC, que posteriormente fue autoclavado en un autoclave (AH, American, Model N° 258 MALTOWOE; WI:54220) a 120 °C y 1,5 atm por 20 minutos, una vez frío el medio de cultivo se procedió a inocular un volumen de 1 mL de suspensión de esporas *T. inhamatum* a una concentración de 10^6 prop/mL posteriormente se procedió a forrar las botellas con papel celofán verde, violeta y papel aluminio como control se empleó un grupo el cual no contaba con filtro, puesto que las botellas eran transparentes, Se consideraron 6 repeticiones por prueba y la actividad se evaluó a los 30 días.

8.4.1.2 Implementación de agitación y aeración en los medios de cultivo.

Se realizó, empleando una bomba de pecera, la cual descargaba el aire a una presión de 20 PSI (medido por una barómetro Cole – Parmer) sobre un matraz que contenía ácido clorhídrico 0.1 N, este a su vez estaba conectado a dos matraces, los cuales contenían medio PDC con esporas de *T. inhamatum* a una concentración 10^6 prop/mL, uno de los matraces al margen de

estar sometido a la aeración, se encontraba bajo agitación mediante un agitador (Fisatan, Agitador Magnético 144524. Brasil). Se tomó muestra cada 7 días en cuatro ocasiones. Como controles se emplearon medios de cultivo, los cuales estaban tanto en agitación como en estanco, la actividad controladora se evaluó a los 28 días.

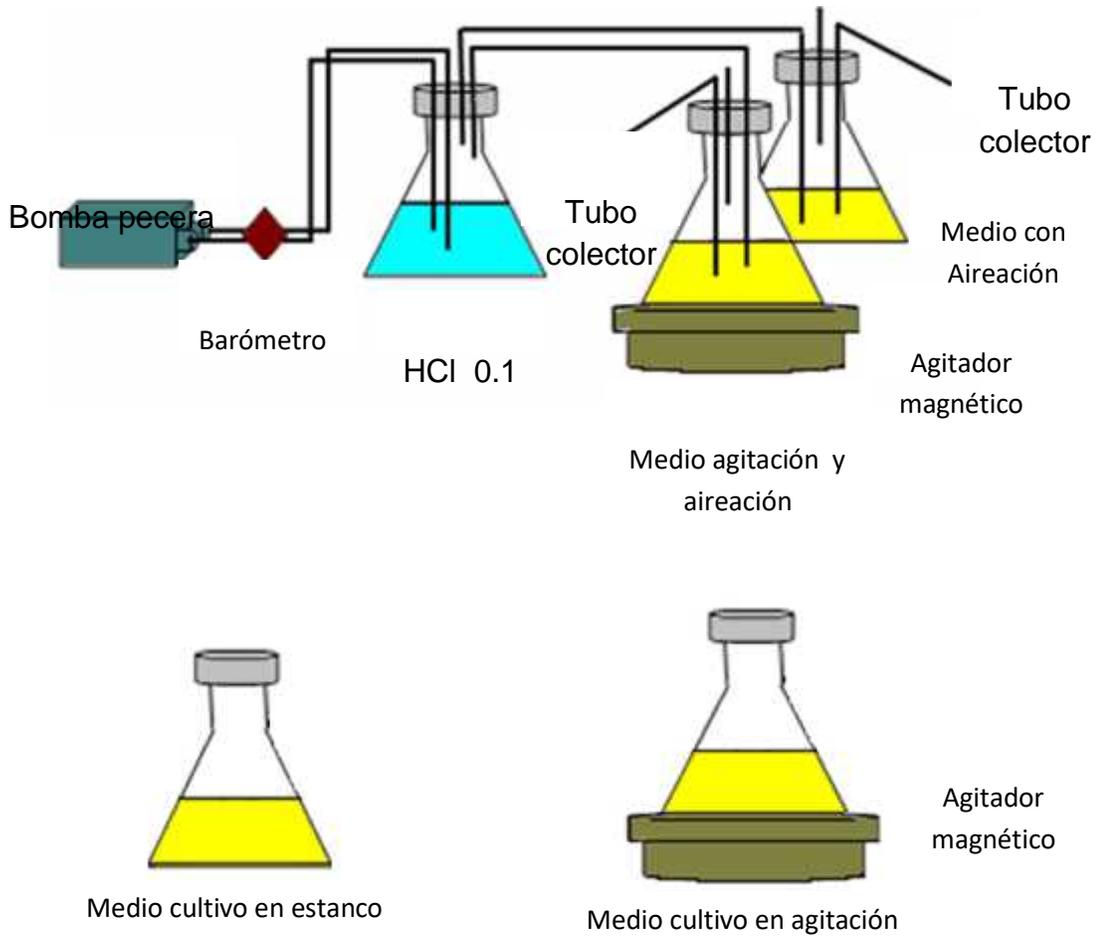


Figura 5. Esquema de medio de cultivo PDC en batch sometidos en: agitación - aeración, aeración, agitación y estanco (IIFB – 2008).

8.4.2 Parámetros Químicos.

8.4.2.1 Evaluación de la adición de nitrato de amonio en el caldo de cultivo PDC.

Este procedimiento se realizó en botellas de vidrio de 100 mL a las cuales se alicuotó un volumen de 50 mL de caldo de cultivo PDC (al cual se le adicionó 1 g/L de nitrato de amonio), este fue auto clavado a 1,5 atm y 120 °C por 20 minutos, una vez frío el medio de cultivo, se procedió a inocular un volumen de 1000 µL de suspensión de esporas del *T. inhamatum* a una concentración de 10^6 prop/mL, posteriormente se procedió a forrar las botellas con papel celofán de color verde, violeta, para evaluar el efecto oscuridad sobre el hongo, las botellas se las forra con papel aluminio y como control se tomó las botellas transparentes. La evaluación de la actividad controladora se realizó a los 30 días.

8.4.2.2 Evaluación de Temperatura, Fuente de Carbono y pH.

Este procedimiento se realizó mediante diseño factorial 3^3 en donde se probaron diferentes fuentes de carbono temperatura y pH.

Tabla 3. Diseño experimental de la evaluación de temperatura, fuente de carbono y pH, (IIFB – 2008).

Fuente de Carbono	Temperatura	pH	Numero de repeticiones
Glucosa	4	3	3
Glucosa	4	4	3
Glucosa	4	5	3
Glucosa	22	3	3
Glucosa	22	4	3
Glucosa	22	5	3
Glucosa	37	3	3
Glucosa	37	4	3
Glucosa	37	5	3
Cáscara de Papa	4	3	3
Cáscara de Papa	4	4	3
Cáscara de Papa	4	5	3
Cáscara de Papa	22	3	3
Cáscara de Papa	22	4	3
Cáscara de Papa	22	5	3
Cáscara de Papa	37	3	3
Cáscara de Papa	37	4	3
Cáscara de Papa	37	5	3
Aserrín	4	3	3
Aserrín	4	4	3
Aserrín	4	5	3
Aserrín	22	3	3
Aserrín	22	4	3
Aserrín	22	5	3
Aserrín	37	3	3
Aserrín	37	4	3
Aserrín	37	5	3

Para la preparación de los medios de cultivo se empleó 250 g/L de: papa, cáscara de papa y aserrín, a las que se adición de 5 g/L de glucosa, el ajuste del pH se realizó adicionando NaOH al 0.1 N, el cual se midió mediante un equipo pH portatil, pHmetro HI 824 (HANNA Instruments). Previamente se calibro con soluciones tampón de pH 4, 7 y 10 a temperatura ambiente.

Las fuentes de carbono se alícuotaron en frascos de 100 mL a un volumen de 50 mL, que posteriormente fue esterilizado, una vez frio el medio de cultivo se adicionó 1000 µL de la suspensión de *T. inhamatum* a concentración de 10^6 prop/mL, se considero tres repeticiones por prueba, la actividad se evaluó a los 30 días.

8.4.3 Parámetros Biológicos.

8.4.3.1 Co – cultivo del patógeno mediante el uso de esporas.

Se emplearon 27 frascos de 100 mL, en los cuales se alícuotó 50 mL de medio PDC, posteriormente se esterilizo el medio de cultivo, una vez frio se inoculó *T. inhamatum* a concentraciones de 10^2 , 10^4 y 10^6 prop/mL; pasado 7 días de realizado el inoculó inicial, se procedió a inocular concentraciones de 10^2 , 10^4 y 10^6 pro/mL de *B. fabae*, en este modelo experimental se empleó un diseño factorial de tipo 3^2 , la actividad controladora se evaluó a los 30 días.

Tabla 4. Diseño factorial de la prueba co – cultivo mediante el uso de esporas, (IIFB – 2008).

Concentración de <i>T. inhamatum</i>	Concentración de <i>B. fabae</i>	Numero de repeticiones
10^2	10^2	3
10^2	10^4	3
10^2	10^6	3
10^4	10^2	3
10^4	10^4	3
10^4	10^6	3
10^6	10^2	3
10^6	10^4	3
10^6	10^6	3

8.4.3.2 Co – cultivo del patógeno mediante el uso de biomasa.

Se emplearon 27 frascos de 100 mL, en los cuales se peso 250 mg, 500 mg y 750 mg de biomasa atenuada (autoclavada) de *B. fabae* (que se obtuvo previa fermentación de 30 días), posteriormente se añadió 50 mL de medio PDC, los frascos se esterilizaron en un autoclave, una vez frio, se inoculó *T. inhamatum* a concentraciones de 10^2 , 10^4 y 10^6 prop/mL; en este modelo experimental se empleó un diseño de tipo 3^2 , la actividad controladora se evaluó a los 30 días.

Tabla 5. Diseño factorial de la prueba de co – cultivo con el empleo de biomasa, (IIFB – 2008).

Biomasa de <i>B. fabae</i>	Concentración de <i>T.</i> <i>inhamatum</i>	Numero de repeticiones
250 mg	10^2	3
500 mg	10^4	3
750 mg	10^6	3
250 mg	10^2	3
500 mg	10^4	3
750 mg	10^6	3
250 mg	10^2	3
500 mg	10^4	3
750 mg	10^6	3

8.5 Actividad biocontroladora del fermento.

Para evaluar la actividad de los fermentos, primeramente se centrifugó el sobrenadante a 12000 rpm por un tiempo de 5 min, en una centrifugadora refrigerada (Modelo 2-16PK – GERMANY) a 5 °C, y posteriormente se filtró este sobrenadante en papel filtro de nitrocelulosa de 0.2 μ m, este procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar estéril.

Obtenidos los filtrados, se procedió a realizar la prueba de dilución en placa, la cual consiste en mezclar el sobrenadante filtrado con agar a una dilución 1 en 2, el cual se vierte en cajas Petri de 10 mL una vez agarizado, mediante un sacabocado de 0.5 mm de diámetro se procede a retirar agar de la parte central de la caja, en la que se inoculó al patógeno a una concentración de 10^6 prop/mL (*B. fabae*), como control se empleó el fungicida mancoceb, y agua destilada estéril. El crecimiento se midió cada 24 horas.

8.6 Actividad enzimática del hongo antagonista y patógeno.

8.6.1 Evaluación cualitativa de la producción enzimática de *T. inhamatum* y *B. fabae* en medios de cultivo específicos.

La evaluación de la actividad enzimática del hongo *T. inhamatum* y *B. fabae*, se evaluó en medios de cultivo, con sustratos específicos preparados en medio basal (composición medio basal anexo 3), evaluando así de forma cualitativa las actividades enzimáticas: proteolítica, lipolítica, pectinolítica, xilanolítica, celulolítica, amilolítica y quitinolítica (composición de medios de cultivo anexo 4).

8.6.2 Evaluación cuantitativa de la producción enzimática de *T. inhamatum* BOL 12 QD, en medio de cultivo PDC

8.6.2.1 Obtención de los sobrenadantes

Los sobrenadantes estudiados, fueron obtenidos de los cultivos que se sometieron a parámetros físicos: agitación, aireación, aireación y agitación, de los días 7; 14; 21; 28, de fermentación. El sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min. a una temperatura de 5 °C, en una centrifugadora refrigerada y posteriormente se filtro este sobrenadante en papel de nitrocelulosa de 0.2 µm.

8.6.2.1.1 Actividad Glucolítica y Xilanolítica.

Esta técnica se realizó por el método modificado del ácido dinitrosalicílico (DNS) (composición, Anexo 5) según Miller (1959), descrito por Álvarez et al., (2005) y Chambi et al., (2007).

Para este fin se estableció curvas de calibración, usado como estándares la glucosa y xilosa en diluciones seriadas, Mientras los sustratos para las reacciones enzimáticas fueron Carboximetilcelulosa (CMC) biotransformada en p-nitrofenilglucopiranosido (PNPG) y xilano, en p- nitrofenilxilanopiranosido (PNPX). La cuantificación se realizó mediante un equipo de ELISA Biotec L 800.

Tabla 6 Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática celulolítica y xilanolítica, (IIFB – 2006).

Blanco	Control	Test
--------	---------	------

Sustrato *	450 µL	450 µL	450 µL
Enzima **	-	-	50 µL
Incubar a 50 °C , durante 60 minutos luego añadir			
DNS	750 µL	750 µL	750 µL
Incubar a ebullición durante 5 minutos, enfriar y leer la absorbancia a 540 nm λ .			

* 0.5 % Carboximetilcelulosa en buffer citrato a pH = 4.8, para actividad celulolítica.

0.2 % Xilano en buffer fosfato a pH = 6, para actividad xilanolítica.

** Procedente de cultivos en batch (agitación – aireación, aireación, agitación y estanco).

La actividad enzimática se midió en unidades internacionales por litro, Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol/min de azúcar reductor expresado como equivalentes de glucosa o xilosa.

8.6.2.1.2 Actividad Amilolítica

La actividad amilolítica se determino según la técnica modificada por Castro et al., (2003), en la cual, se usa una solución de almidón soluble (Merck) tamponada, que es sometida a una hidrólisis enzimática, la cual se determino mediante método del ácido dinitrosalicílico (DNS), y se cuantifico mediante espectrofotometría

Tabla 7. Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática amilolítica, (IIFB – 2008).

	Blanco	Control	Test
Sustrato *	250 µL	500 µL	500 µL
Enzima **	50 µL	-	50 µL
Buffer ***	50 µL	-	-
Incubar a 30 °C , durante 30 minutos luego añadir			
DNS *****	1500 µL	1500 µL	1500 µL
Incubar a ebullición durante 10 minutos			
H₂O *****	2500 µL	2500 µL	2500 µL
enfriar y leer la absorbancia a 540 nm λ .			

* 1 % Almidón soluble en buffer citrato a pH = 4.8,

** Procedente de cultivos en batch (agitación – aireación, aireación, agitación y estanco).

8.6.2.1.3 Actividad Pectinolítica

La cuantificación de pectinasas se realizó mediante el método del (DNS) (Mutlu et al 1999) siendo el sustrato una dispersión de pectina (pH 4.5).

Tabla 8. Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática pectinolítica, (IIFB – 2008).

	Blanco	Control	Test
Sustrato *	900 µL	900 µL	900 µL
Enzima **	-	-	100 µL
Incubar a 15 °C , durante 45 minutos luego añadir			
DNS *****	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Incubar a ebullición durante 10 minutos			
enfriar y leer la absorbancia a 590 nm λ .			

* 0.2 % p/v pectina buffer acetato pH = 4.5.

** Procedente de biorreactor, (agitación – aireación, aireación, agitación, y estanco).

8.6.2.1.4 Actividad Quitinolítica

Esta actividad se determinó, midiendo el cambio densidad óptica generado por los productos de hidrólisis conjugados con colorantes específicos. (Bergmeyer 1984, Segel 1982), empleando la ley de Lambert y Beer ($A = \epsilon C \cdot l$) donde (A) es la absorbancia, (ϵ) es el coeficiente de extinción específico del producto formado durante la reacción y (l) la longitud del espesor de la celda utilizada para el paso de la luz a través de la solución.

Tabla 9. Esquema del procedimiento analítico para la determinación de la actividad enzimática quitinolítica, (IIFB – 2008).

	Blanco	Control	Test
Sustrato *	900 μ L	900 μ L	200 μ L
Enzima **	-	-	100 μ L
Buffer ***	250 μ L	-	-
Incubar a 50 °C, durante 30 minutos, detener la reacción a – 15 °C.			
Reactivo de Somogyi I	250 μ L	200 μ L	200 μ L
Reactivo de Somogyi II	250 μ L	50 μ L	50 μ L
Incubar a 92 °C, durante 30 minutos y enfriar			
Reactivo de Nelson	250 μ L	250 μ L	250 μ L
H₂O	-	1000 μ L	1000 μ L
16 horas después centrifugar y leer la absorbancia a 595 nm λ			

* 5 % p/v quitina en buffer acetato de sodio 0.1 M, pH = 5.

** Procedente de cultivos en batch (agitación – aireación, aireación, agitación y estanco).

El coeficiente de extinción de la quitina es de $\epsilon = 10/M/cm$ (Reissig et al. 1957).

8.7 Evaluación de la actividad del fermento en las parcelas de haba (Prueba de campo)

Esta evaluación se realizó en la comunidad Chua Cocani, perteneciente a la provincia Los Andes del departamento de La Paz. Esta comunidad se encuentra ubicada a 50 Km. de la nuestra ciudad a una Altura de 3830 msnm, el presente estudio se realizó en parcelas de la Asociación Flor de Haba, en coordinación con PROIMPA.

8.7.1 Preparación del Biorreactor para la producción de 20 L de fermento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD

Para este objeto se empleó una botellón de un volumen de 30 L, el cual fue esterilizado previa utilización, se emplearon 12.5 Kg de papa y 100 g de glucosa. Se añadió un volumen de 10 mL de una suspensión de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, este procedimiento se llevó a cabo en campana de flujo laminar estéril, el proceso de fermentación para este volumen es de 180 días.

8.7.2 Diseño del terreno de experimentación, ecotipos de estudio y tratamientos.

El área de estudio se encontraba geográficamente a 16°11'589" latitud sur, 68°44'33" longitud oeste y a una altura de 3834 msnm. La superficie sobre la que se trabajó fue de aproximadamente 896 m², la cual se dividió en dos segmentos de 448 m², en la primera fracción del terreno, se sembró el ecotipo Isla del sol, y en la segunda el ecotipo Gigante Copacabana, como separación entre ambos ecotipos, se dejó dos surcos.

Para la prueba de los tratamientos sobre los ecotipos, se procedió a dividir ambos segmentos del terreno en grupos de tratamiento teniendo un total de 10. A su vez cada parcela se dividió en 3 unidades experimentales, compuesta de ocho surcos de manera de tener 3 repeticiones por tratamiento, y por cada unidad experimental se tomó a seis unidades individuales para el análisis respectivo, de un total de 2400 plántulas de haba. En lo concerniente al orden de los tratamientos, este se realizó al azar con la función RND de una calculadora (CASIO POWER GRAPHIC fx – 7400G PLUS).

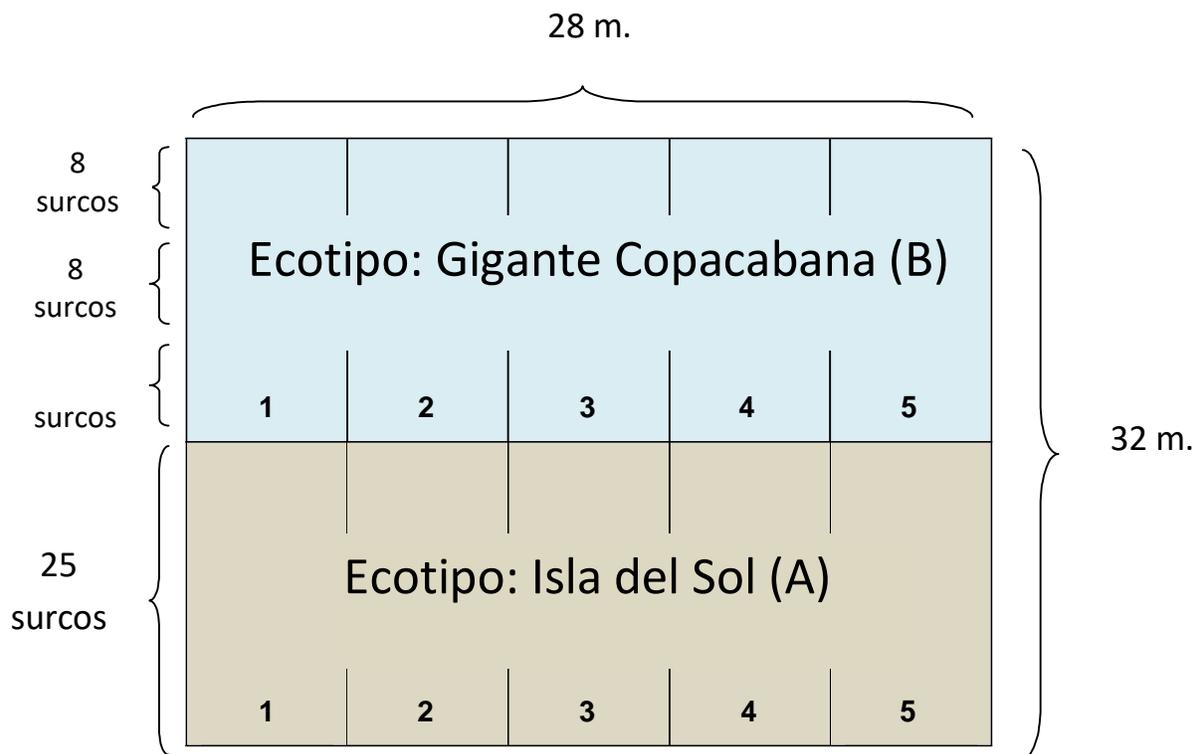


Figura 6. Diagrama de la distribución del terreno de estudio, según ecotipo (A: Isla del Sol; B: Gigante Copacabana) y Tratamiento (1. Testigo, 2. Tricobio Cochabamba, 3. Biosulfocal, 4. *Trichoderma inhamatum* BOL – 12 QD, 5. Esporas *Trichoderma* Cochabamba), (Chua Cocani – 2008).

8.7.3 Preparación de los tratamientos.

8.7.3.1 Tricobio Cochabamba.

La forma de preparación para la aplicación de este producto es: 1 L. de la suspensión de tricobio disuelto en 15 L de agua.

8.7.3.2 Biosulfocal

Compuesto por $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 5.55 % y azufre al 11.10 %, la forma de aplicación es de acuerdo a la siguiente relación: 1 L de biosulfocal disuelto en 15 L de agua.

8.7.3.3 Trichoderma inhamatum cepa BOL – 12 QD

En este estudio se aplicó a una concentración de 1 en 3 (1 L. de fermento de 12 QD disuelto en 3 L. de agua).

8.7.3.4 Esporas Trichoderma spp. Cochabamba.

Se resuspende 1 Kg. este producto en 5 L. de agua, luego se tamiza el mismo, para separar los granos de arroz con los que viene este producto, este procedimiento debe ser realizado en cuatro ocasiones antes de la aplicación.

Para la aplicación de estos tratamientos sobre el follaje, se empleó una mochila fumigadora de 20 L.

8.7.4 Aplicación de los tratamientos.

Se realizaron cuatro aplicaciones de los diferentes tratamientos, los intervalos de tiempo fueron aproximadamente entre 15 y 20 días.

- ✓ Primera aplicación 15 de diciembre de 2008.
- ✓ Segunda aplicación 30 de diciembre de 2008.
- ✓ Tercera Aplicación 15 de enero de 2009.
- ✓ Cuarta aplicación 30 de enero de 2009.

8.7.5 Evaluación de las parcelas por tratamiento y por unidades experimentales

Previa aplicación de los tratamientos, se realizó la evaluación de las parcelas de estudio, en las que se analizaron las siguientes variables:

- Altura
- Número de hojas
- Periodo de floración
- Fructificación del haba:
- Porcentaje de severidad

8.8 Cosecha

8.8.1 Cosecha de las unidades experimentales

Previa cosecha del producto total; de todas las unidades experimentales anteriormente señaladas, se procedió a realizar un análisis individual de la madurez fisiología de la plántula, tomando en cuenta las siguientes variables:

- Altura
- Peso de plántula
- Número de vaina
- Longitud de vaina
- Peso de vaina
- Número de grano por plántula
- Peso del grano por plántula
- Peso grano seco por plántula
- Severidad de la infección

8.8.2 Cosecha del producto por tratamiento y ecotipo

Para este procedimiento se empleó el método de calcha, este método es empleado en las comunidades como método de cosecha para el grano seco; consiste en cortar la plántula desde la base y posteriormente apilarlas en forma vertical. En nuestro procedimiento apilamos 10 calchas, de acuerdo a los tratamientos empleados por ecotipo. El tiempo de secado es aproximadamente de 30 a 45 días.

8.8.3 Trillado y venteado

La trilla se realizó cuando las plantas estuvieron completamente secas, el trillado se realizó por separado de acuerdo al ecotipo y tratamiento. El grupo de estudio compuesto por diez calchas, fueron desgranadas en forma tradicional utilizando herramientas tradicionales (jauk'aña) sobre una lona grande. Posterior a la trilla se realizó el venteo en forma manual, separando de esta manera la broza del grano.

Realizado el venteado del producto, se evaluó el rendimiento total, producido por los tratamientos y ecotipo, mediante una romanilla Pocket balance de 25 Kg.

8.9 Análisis de datos.

El análisis estadístico se realizará por la prueba de ANOVA de simple como de doble vía, empleando para este cometido el software MINITAB 15. Los niveles de probabilidad menores de 0.05 serán considerados como estadísticamente significativos.

CAPITULO IX

RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 HONGO PATÓGENO

En instancia primera para la determinación del microorganismo causante de la mancha chocolate, nos basamos en parámetros estudiados por Ciancas (2006), el cual había trabajado con *Botrytis cinérea* como microorganismo causante de la mancha chocolate, pero según Aleu et al, (2000) y Sahile et al, (2007), el microorganismo característico para la infección de *Vicia faba* es *Botrytis fabae*; esta aseveración fue confirmada en el presente estudio, debido a que, de las muestras obtenidas de las parcelas afectadas por la mancha chocolate, no se presenció crecimiento de *B. cinérea*, mas al contrario se observó un crecimiento muy diferente al reportado por Ciancas (2006).

9.1.1 Aislamiento del microorganismo causante de la mancha chocolate

Una vez aislado el microorganismo se procedió a reproducir el efecto patogénico (postulados de Koch) (Figura 5), al observar el mismo efecto patogénico característico por la aparición de una mancha de tono café, se procedió a aislar las mismas nuevamente con la que se pudo confirmar a este microorganismo como causante de esta enfermedad.

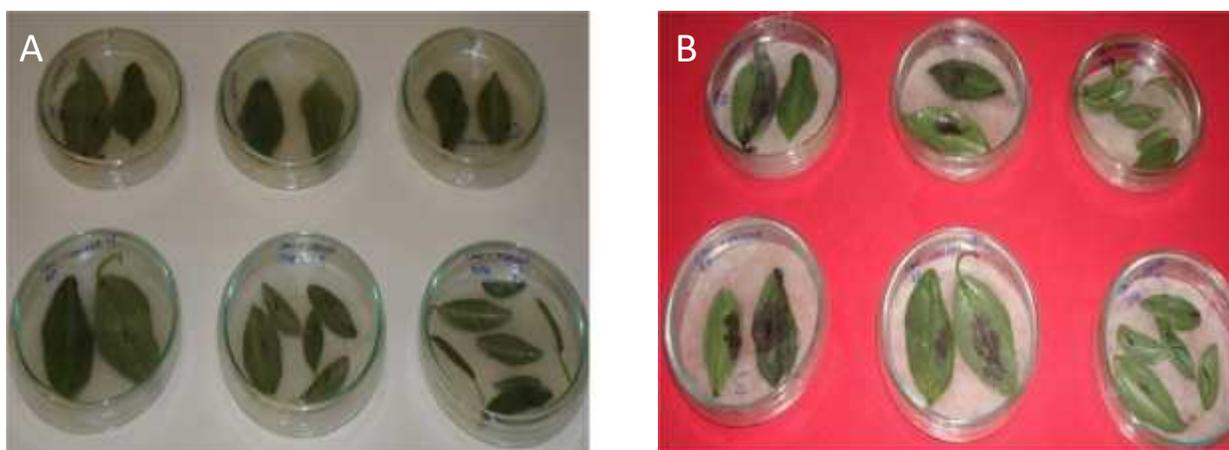


Figura 5. Postulados de Koch; A. Día primero de inculo de las esporas patógenas. B Presencia de la sintomatología de mancha chocolate, (IIFB – 2008).

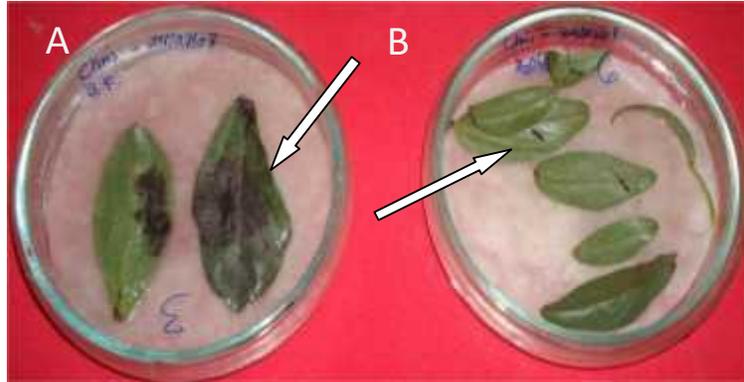


Figura 6. Postulados de Koch. A. Inicio de la infección causada por *B. fabae* luego de 5 días. B. Control inoculado con agua estéril donde no se observa infección alguna a los 5 días, (IIFB – 2008).

9.1.2 Identificación del hongo patógeno

Se realizó mediante observación tanto macroscópica como microscópica.

9.1.3 Observación macroscópica

Para la identificación de este hongo se evaluó las características morfológicas que presentaban en la caja Petri, de las cuales observamos lo siguiente:

Lado anverso se presentaba un aspecto de frente hifal seco, con formación de macroestructuras sexuales presentes en forma de esclerotos, respecto al medio es incoloro.

Lado reverso, presenta un aspecto de frente hifal liso sin pigmentación.

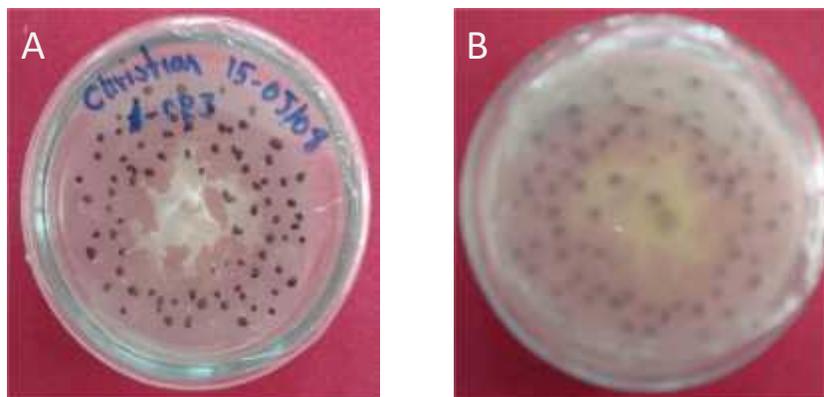


Figura 7. Características morfológicas de *B. fabae*; A. Lado anverso. B. Lado reverso, (IIFB – 2008).

9.2 Evaluación de la Actividad biocontroladora.

9.2.1 Prueba de interacción patógeno – antagonista.

En los enfrentamientos duales realizados se estableció como posibles controladores las cepas *T. inhamatum* BOL 12 QD y BOL 162 QD, que mostraron una actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *B. fabae*. En el caso de *T. inhamatum* se observó una inhibición por contacto de manera que se observó la formación de un halo alrededor de *B. fabae*, inhibiendo el crecimiento del mismo (Figura 8); En cuanto a la cepa BOL – 162 QD, se observó un solapamiento total, por parte de esta cepa sobre *B. fabae* (Figura 9). Resultados similares fueron reportados por Gonzalez et al, (2002), al realizar una prueba similar de dinámica de crecimiento en *Trichoderma spp* frente *F. oxysporum*,

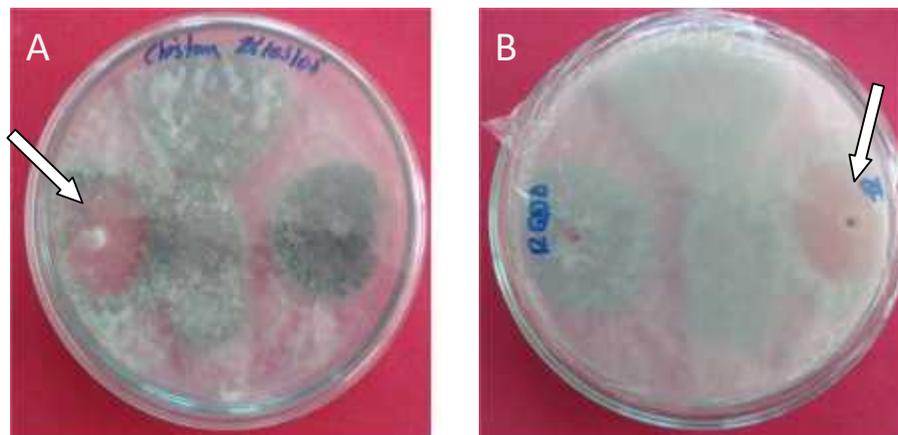


Figura 8. Inhibición por contacto, *T. inhamatum* y el patógeno *B. fabae* luego de 15 días. Obsérvese la formación del halo de inhibición y un crecimiento acelerado por parte del controlador (*T. inhamatum*), (IIFB – 2008).

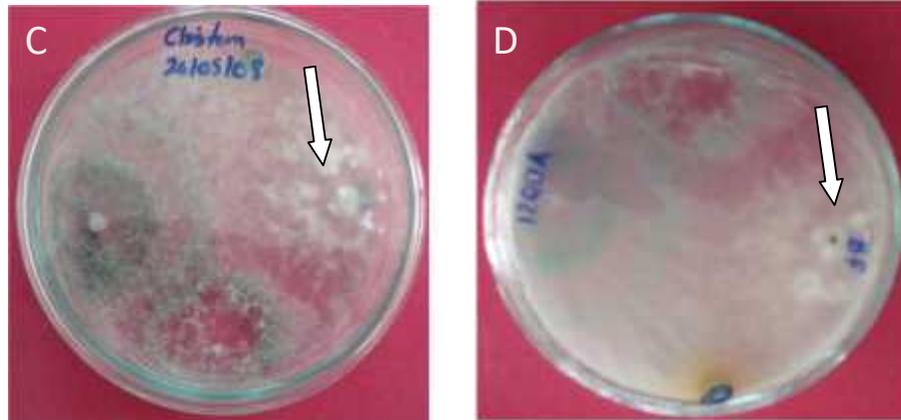


Figura 9. Inhibición por solapamiento. Cepa BOL 162 QD y *B. fabae*, luego de 7 días: Obsérvese como el hongo controlador sobrepasa, cubre y micoparasita al hongo patógeno en una forma de competición por nutrientes, (IIFB – 2008).

La prueba de enfrentamiento dual, es una prueba en la que se observa las características adaptativas del hongo en un medio artificial, si bien existe una inhibición por la acelerada asimilación de nutrientes por el hongo, no debemos dejar de lado las características de crecimiento de los hongos, ya que estos son eucariotas y como tales se caracterizan por su complejidad.

9.3 Evaluación de la producción de metabolitos secundarios antagonistas

Dentro de los parámetros de estandarización de un medio de cultivos se encuentran los aspectos tanto: físicos (luz, aeración, agitación, temperatura), químicos (pH, fuente de carbono, fuente de nitrógeno), Biológicos (actividad enzimática, metabolismo secundario, co – cultivo), que son de vital importancia en desarrollo de todo microorganismo.

9.3.1 Parámetros Físicos

9.3.1.1 Evaluación del efecto de luz sobre *T. inhamatum* cepa BOL – 12 QD

Dentro de los parámetros físicos estudiados está el efecto de luz, mediante esta experiencia se pretende establecer si la luz ejerce un efecto de foto inducción ya sea en el crecimiento o en la liberación de metabolitos secundarios, los resultados de esta prueba se expresan en la tabla 10.

Tabla 10, Efecto de distintos filtros de luz sobre la producción de metabolitos secundarios por *T. Inhamatum* y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, (IIFB – 2008).

Control	Filtros	Concentración de <i>T. inhamatum</i>	Características de crecimiento e inhibición de <i>B. fabae</i> durante 5 días		
			Velocidad de crecimiento (día)	Crecimiento hifal máximo (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
<i>B. fabae</i> PDA	-	-	5,10	25,34	-
Mancoceb	-	-	-	-	100,00
-	Lila	10 ⁶ prop/mL	3,20	11,93	52,84
-	Transparente	10 ⁶ prop/mL	3,68	14,46	42,80
-	Verde	10 ⁶ prop/mL	3,20	12,34	51,29
-	Oscuridad	10 ⁶ prop/mL	4,29	17,64	30,37

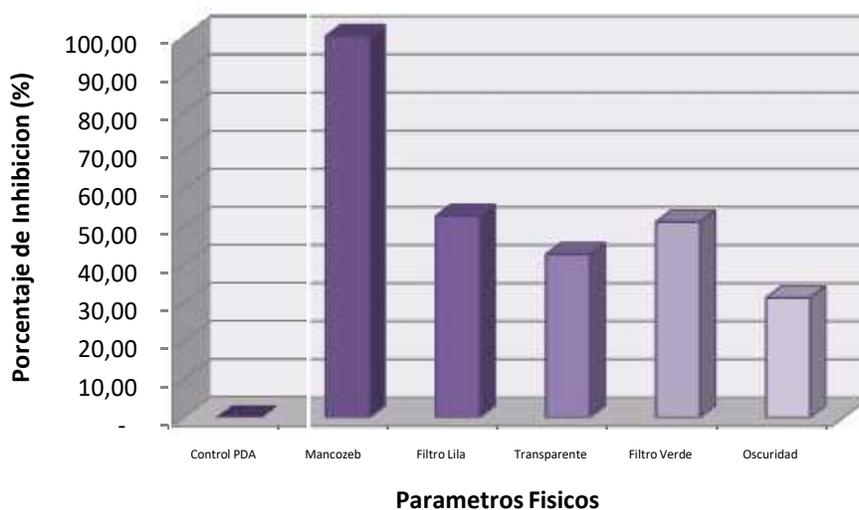


Figura 10. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto del fermento de *T. inhamatum* sometido a diferentes filtros de luz, (IIFB – 2008).

One-way ANOVA: Filtros de luz

Source	DF	SS	MS	F	P
Filtro	3	954,83	318,28	52,35	0,000
Error	8	48,63	6,08		
Total	11	1003,46			

El resultado obtenido respecto al porcentaje de inhibición de crecimiento de *B. fabae* establece una clara diferencia estadísticamente significativa para un ($p < 0.05$), este fenómeno se observa en los experimentos que fueron sometidos a los filtros lila y verde, puesto que estos fermentos produjeron una inhibición de 52.84 % y 51.29 % respectivamente, pero si comparamos estas actividades con el control Mancoceb (fungicida), solo logramos alcanzar un 50 % de actividad.

Los resultados obtenidos establecen, que la luz si cumple un efecto fotoinductor sobre *T. inhamatum*, para esta prueba se tomo como control al experimento que no contaba con ningún filtro (transparente); En los experimentos sometidos a los filtros lila y verde se observó un crecimiento acelerado de la biomasa y un cambio de coloración en los medios de cultivo a siete días de realizada la inoculación del controlador. En cambio, el experimento sometido a oscuridad presentó un crecimiento lento y del mismo modo la coloración del medio era menos intensa que la del control, este fenómeno quizá se deba a que, cuando existen variaciones de luz en los medios de cultivo, se iniciaría la liberación de compuestos que causarían la lisis de la pared fúngica (Pérez, 2007), aunque en nuestro caso, la ausencia de luz establece su importancia en el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios.

9.3.1.3 Implementación de agitación y aeración en los medios de cultivo.

Tabla 11. Evaluación de la actividad de los cultivo en batch sometidos a parámetros físicos (1: Agitación – aeración; 2: Aeración; 3: Agitación; 4: Estanco), sobre la producción de metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas por *T. inhamatum* BOL 12 – QD y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, a los 30 días de experimentación, (IIFB – 2008).

Parámetro físico	Control	Actividad Enzimática					Características de crecimiento e inhibición de <i>B. fabae</i> durante 5 días		
		Glucolítica UI/L	Xilanolítica UI/L	Amilolítica UI/L	Pectinolítica UI/L	Quitinolítica (*)	Velocidad de crecimiento (día)	Crecimiento hifal máximo (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
-	<i>B. fabae</i>	-	-	-	-	-	5,10	25,34	-
-	Mancoceb	-	-	-	-	-	-	-	100,00
1	-	100,69	62,15	31,48	5,06	18,00	4,22	21,12	16,66
2	-	35,42	13,08	150,00	8,83	162,60	2,68	10,70	57,76
3	-	62,62	16,74	17,59	3,41	238,00	2,08	8,33	67,11
4	-	49,64	7,81	62,04	6,41	101,45	3,69	14,76	41,74

(*) mmol/L mg. P N - Acetilglucosamina

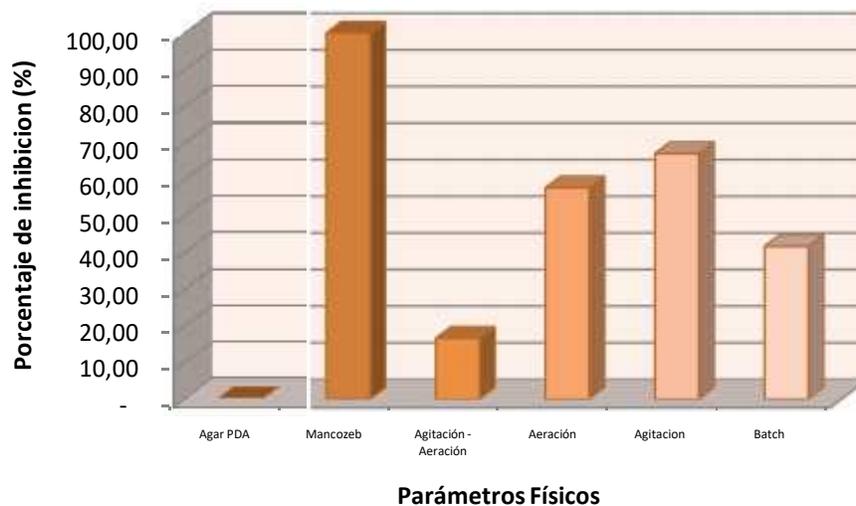


Figura 11. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto de los parámetros físicos aplicados a los cultivos en batch de *T. inhamatum*, (IIFB – 2008).

One-way ANOVA: Parámetro físicos

Source	DF	SS	MS	F	P
P. físicos	3	4388,29	1462,76	419,85	0,000
Error	8	27,87	3,48		
Total	11	4416,16			

Los resultados obtenidos establecen una clara diferencia entre los parámetros físicos, debido a que estos son estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

La interacción entre actividades: enzimáticas y antibióticas (metabolitos secundarios), sin duda, es importante en el desarrollo del biocontrol. Cuando se somete un medio de cultivo a una variable física como la agitación y/o aeración podemos observar que las actividades enzimáticas son diferentes, del mismo modo, la capacidad controladora de los metabolitos secundarios también difiere (tabla 9). Una de estas enzimas que presenta una relación con la capacidad controladora es la quitinasa, que como se observa en la tabla 9, parece jugar un papel crucial en el control de esta enfermedad, según Michel (2001), algunas cepas de *Trichoderma spp*, que presentan actividad quitinolítica, son capaces de inhibir el crecimiento de patógenos a partir de una concentración de 10 μmol de N-acetilglucosamina liberados por la hidrólisis de la quitina; en nuestro caso el mejor registro enzimático de quitinasa, fue en el medio sometido a agitación, en la que obtuvimos una concentración de 238 mmol/L mg de N-acetilglucosamina liberados, seguido del medio de cultivo sometido en aeración.

No debemos dejar de lado que las otras actividades enzimáticas también participan en el proceso de biocontrol, tal es el caso de la pectinasas y celulasas que aunque no presentan resultados significativos, también son parte del proceso de biocontrol (Corteje & Lorito 2007).

Sin embargo, el análisis de la actividad inhibitoria, de los fermento en batch sometidos a las variables físicas, fue realizado a los 30 días de fermentación, y no se tomaron en cuenta los días intermedios, como se realizó en el análisis enzimático que se reporta mas adelante.

9.3.2 Parámetros Químicos.

9.3.2.1 Evaluación de la adición de nitrato de amonio

En el metabolismo de todo organismo es muy importante la presencia de nitrógeno y los hongos no son la excepción, ya que, algunos de los compuestos químicos con actividad biológica que son sintetizados por estos microorganismos, presentan en su estructura al nitrógeno. En tal razón se adiciono nitrato de amonio a los medios de cultivo PDC, debido a que este compuesto había sido reportado como un factor que incrementaría la actividad biocontroladora de *T. inhamatum* (Apaza et al, 2008); además que en esta prueba también se evaluó el efecto de luz sobre estos medios.

Tabla 12. Efecto de la luz y la adición de Nitrato de Amonio al medio PDC, sobre la producción de metabolitos secundarios por *T. Inhamatum* y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, (IIFB – 2008).

Control	Filtros	Concentración de <i>T. inhamatum</i>	Nitrato de Amonio	Características de crecimiento e inhibición de <i>B. fabae</i> durante 5 días		
				Velocidad de crecimiento (día)	Crecimiento hifal máximo (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
<i>B. fabae</i> PDA	-	-	-	5,10	25,34	0,00
Mancoceb	-	-	-	-	-	100,00
-	Lila	10 ⁶ prop/mL	1 g/L	4,63	23,99	5,34
-	Transparente	10 ⁶ prop/mL	1 g/L	11,21	22,42	11,52
-	Verde	10 ⁶ prop/mL	1 g/L	11,50	23,00	9,22
-	Oscuridad	10 ⁶ prop/mL	1 g/L	8,80	22,63	10,69

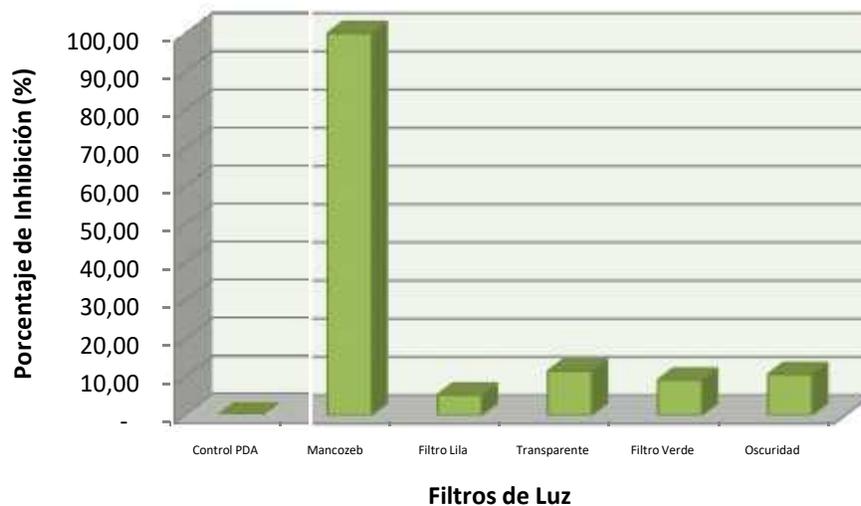


Figura 12. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto de fermento de *T. inhamatum* sometido a diferentes filtros de luz con la adición de nitrato de amonio al medio, (IIFB – 2008).

One-way ANOVA: Filtros de Luz – Nitrato de amonio

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	3	67,31	22,44	2,40	0,143
Error	8	74,64	9,33		
Total	11	141,94			

Respecto al análisis varianza, los resultados no reportan significancia estadística, cuando se añade nitrato de amonio al medio de cultivo, ni cuando estos son sometidos a diferentes filtros de luz, mas al contrario existe una inhibición en la producción de metabolitos secundarios activos, como se observa en la grafica. Según Martínez, et al. (2005), las fuentes de carbono o nitrógeno pueden limitar la síntesis de enzimas y disminuir la degradación de los compuestos nutricionales que se encuentran en el medio, del mismo modo Sánchez et al. (1981), reporta estudió la regulación de nitrógeno en la formación de penicilina G por *P. chrysogenum*, se encontró que existe una interrupción de la síntesis, a una concentración de 85 mM de Nitrógeno. Comparando estos resultados con los fermentos a los cuales no se adiciono nitrato de amonio, se observa como negativa la adición de nitrato de amonio al medio de cultivo PDC, ya que se inhibe la actividad controladora de *T. inhamatum*.

9.3.3 Parámetros Biológicos.

9.3.3.1 Co – cultivo del patógeno mediante el uso de esporas.

El co – cultivo o elicitado de medio, es una prueba en la que, se pretende mejorar las características controladoras del hongo controlador (*T. inhamatum* BOL 12 – QD), al someter a hongo controlador frente al organismo patógeno (*B. fabae*), esta prueba es similar a los enfrentamientos duales, solo que se realiza en medio líquido y primeramente se inocula al controlador y posteriormente pasado 5 días al patógeno.

Tabla 13. Efecto de la concentración de prop/mL de *B. fabae* y *T. inhamatum*, sobre la producción de metabolitos secundarios *T. inhamatum* BOL 12 – QD y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, (IIFB – 2008).

Características de crecimiento e inhibición de <i>B. fabae</i> durante 5 días					
Control	Concentración de <i>B. fabae</i>	Concentración de <i>T. inhamatum</i>	Velocidad de crecimiento (día)	Crecimiento hifal máximo (mm)	Porcentaje de inhibición %
Agar PDA	-	-	5,10	25,34	0
Mancoceb	-	-	0,00	0	100
-	10 ² prop/mL	10 ² prop/mL	4,06	16,23	32,95
-	10 ² prop/mL	10 ⁴ prop/mL	3,76	15,03	40,68
-	10 ² prop/mL	10 ⁶ prop/mL	3,09	12,36	51,21
-	10 ⁴ prop/mL	10 ² prop/mL	3,52	14,07	44,49
-	10 ⁴ prop/mL	10 ⁴ prop/mL	3,27	13,06	48,45
-	10 ⁴ prop/mL	10 ⁶ prop/mL	3,76	15,03	40,67
-	10 ⁶ prop/mL	10 ² prop/mL	3,13	12,52	50,57
-	10 ⁶ prop/mL	10 ⁴ prop/mL	3,68	18,39	27,41
-	10 ⁶ prop/mL	10 ⁶ prop/mL	3,42	17,09	32,55

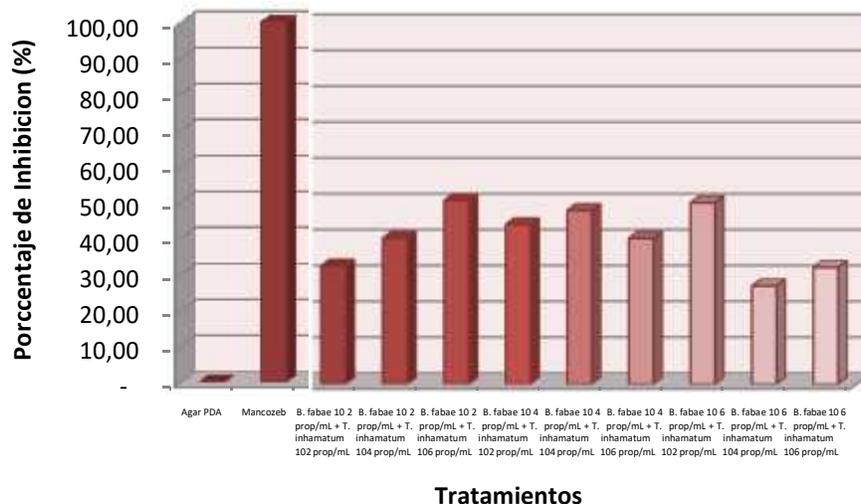


Figura 13. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto del co – cultivo de esporas de *B. fabae* en fermentos de *T. inhamatum*, (IIFB – 2008).

Two-way ANOVA: Porcentaje de inhibición; versus; B. fabae. T. inhamatum

Source	DF	SS	MS	F	P
<i>B. fabae</i>	2	231,74	115,868	14,45	0,000
<i>T. inhamatum</i>	2	162,12	81,058	10,11	0,001
Interacción	4	1126,55	281,636	35,13	0,000
Error	18	144,30	8,017		
Total	26	1664,70			

Dentro los resultados obtenidos, podemos observar que tanto la concentración de esporas de *B. fabae* y de *T. inhamatum*, influyen en la producción de metabolitos secundarios.

La atenuación o elicitado, es un proceso por el cual se pretendió estimular aun mas la actividad controladora de *T. inhamatum*, aunque la mejor actividad reportada solo alcanza al 51 %, este resultado se aproxima bastante a los obtenidos, cuando se emplearon filtros de luz sobre los fermentos.

Según Corteje y Lorito (2007) *Trichoderma* tiene la capacidad de detección, de agentes patógenos, de manera que se iniciaría un proceso de defensa, mediante metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas. Las concentraciones extremas en esta prueba, presentan resultados bastante interesantes, a una concentración de: 10² prop/mL de *B. fabae* - 10⁶ prop/mL *T. inhamatum* y 10⁶ prop/mL de *B. fabae* - 10² prop/mL *T. inhamatum*, el porcentaje de de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, fue del 51 y 50 % respectivamente.

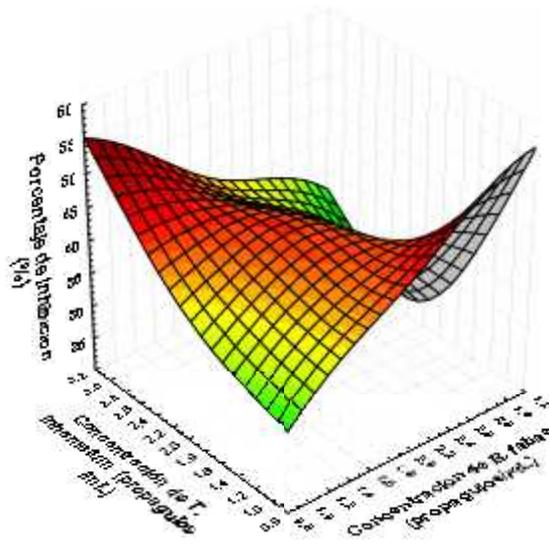


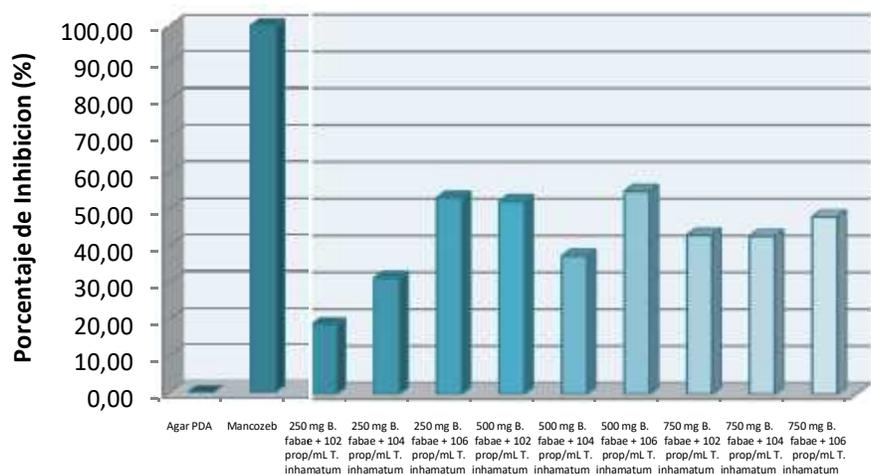
Figura 14. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto del fermento de *T. inhamatum*, producido a diferentes concentraciones prop/mL de *B. fabae*, y *T. inhamatum*, (IIFB – 2008).

9.3.3.2 Co – cultivo del patógeno mediante el uso de biomasa atenuada.

Para la realización de esta técnica, se basó en el fundamento de inmunización, para lo cual, se empleo biomasa atenuada de *B. fabae*, con la finalidad de inducir una respuesta por parte *T. inhamatum*, la tabla 14 refleja los resultados obtenidos.

Tabla 14. Efecto de la Biomasa de *B. fabae* y la concentración de prop/mL de *T. Inhamatum*, sobre la producción de metabolitos secundarios del mismo y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, (IIFB – 2008).

Características de crecimiento e inhibición de <i>B. fabae</i> durante 5 días					
Control	Biomasa de <i>B. fabae</i>	Co centración de <i>T. inhamatum</i>	Velocidad de crecimiento (día)	Crecimiento hifal máximo (mm)	Porcentaje de inhibición %
Agar PDA	-	-	5.10	25,34	0,00
Mancoceb	-	-	0.00	0,00	100,00
-	250 mg	10 ² prop/mL	5.05	20,56	18,86
-	250 mg	10 ⁴ prop/mL	3,63	17,33	31,53
-	250 mg	10 ⁶ prop/mL	3,93	11,83	53,30
-	500 mg	10 ² prop/mL	3,49	12,05	52,35
-	500 mg	10 ⁴ prop/mL	3,33	15,83	37,54
-	500 mg	10 ⁶ prop/mL	3,01	11,38	55,11
-	750 mg	10 ² prop/mL	3,79	14,38	43,21
-	750 mg	10 ⁴ prop/mL	3,66	14,48	42,87
-	750 mg	10 ⁶ prop/mL	3,53	13,21	48.14



Co - cultivo de biomasa

Figura 15. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto del co – cultivo de biomasa de *B. fabae* en fermentos de *T. inhamatum*, (IIFB – 2008).

Two-way ANOVA: % de inhibición; versus; *B. fabae*. *T. inhamatum*

Source	DF	SS	MS	F	P
Biomasa de <i>B. fabae</i>	2	488,42	244,21	10,24	0,001
Concentración <i>T. inhamatum</i>	2	2050,77	1025,38	42,99	0,000
Interacción	4	674,07	168,52	7,07	0,001
Error	18	429,29	23,85		
Total	26	3642,55			

Para un nivel de confianza del 95 %, encontramos que los resultados obtenidos son significativos, no solo individualmente, sino que tanto la biomasa de *B. fabae* y la concentración de propágulos de *T. inhamatum*, influyen en la producción de metabolitos secundarios, como se puede observar en la tabla 14.

Respecto al porcentaje de inhibición, se encontró que existen tres concentraciones a las cuales la actividad de inhibición es mayor al 50 %, en tal caso, con estos resultados, podemos partir para la optimización de esta técnica bajo otros parámetros de estudio, con la finalidad de mejorar aun más esta actividad.

Existen ciertas estructuras químicas que cumplen un papel en la activación de ciertos genes de *Trichoderma*, si bien el mecanismo por el cual existiría la estimulación en la producción de metabolitos secundarios por parte de la biomasa de *B. fabae*, si es evidente que cumple un rol muy importante en la inducción de metabolitos activos.

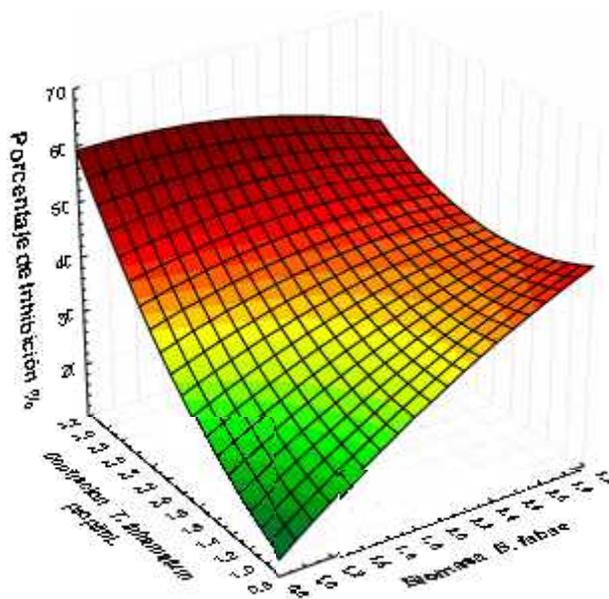


Figura 16. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto del fermento de *T. inhamatum*, producido a diferentes concentraciones de biomasa de *B. fabae* y prop/mL de *T. inhamatum*, (IIFB – 2008).

9.4. Efecto de la Fuente de Carbono, temperatura y pH

Tabla 15. Efecto de la Fuente de Carbono, temperatura y pH, sobre la producción de metabolitos secundarios y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, (IIFB – 2008).

Control	Fuente de Carbono	Temperatura °C	pH	Características de crecimiento e inhibición de <i>B. fabae</i> durante 5 días		
				Velocidad de crecimiento (día)	Crecimiento hifal máximo (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
B. fabae PDA	-	-	-	5,1	25,34	-
Mancoceb	-	-	-	-	-	100,00
	Papa	4	3	4,54	22,68	10,48
	Papa	4	4	4,11	20,56	18,88
	Papa	4	5	4,37	21,87	13,7
	Papa	22	3	3,2	14,39	43,21
	Papa	22	4	3,15	12,6	50,29
	Papa	22	5	3,17	12,16	52,01
	Papa	37	3	3,93	19,65	22,47
	Papa	37	4	3,73	18,65	26,4
	Papa	37	5	3,81	19,07	24,76
	Cáscara de papa	4	3	4,34	21,68	14,45
	Cáscara de papa	4	4	4,26	21,29	15,98
	Cáscara de papa	4	5	4,11	20,53	19
	Cáscara de papa	22	3	3,03	13,65	46,14
	Cáscara de papa	22	4	3,08	12,54	51,3
	Cáscara de papa	22	5	2,93	11,72	54,74
	Cáscara de papa	37	3	3,8	19,02	24,94
	Cáscara de papa	37	4	3,73	18,65	26,39
	Cáscara de papa	37	5	3,14	15,7	38,04
	Aserrín	4	3	4,8	22,68	5,24
	Aserrín	4	4	4,91	20,56	3,05
	Aserrín	4	5	4,73	21,87	6,59
	Aserrín	22	3	3,49	15,99	31,16
	Aserrín	22	4	3,68	15,75	27,38
	Aserrín	22	5	3,15	15,58	37,91
	Aserrín	37	3	4,14	19,65	18,29
	Aserrín	37	4	4,75	18,65	6,24
	Aserrín	37	5	4,05	20,27	20,02

Los resultados obtenidos expresan que la temperatura a 22 °C y los pH entre 4 - 5, influyen en la actividad de *T. inhamatum*, esto se observó cuando se empleo como fuente de carbono el filtrado de papa y su cáscara, en cuanto al empleo de aserrín como fuente de carbono se obtuvieron resultados negativos sobre el control de *B. fabae*, este factor se debe a que no todos los sustratos pueden ser asimilados por los mecanismos enzimáticos para metabolizarse, y mas aun algunas de estas fuentes de carbono pueden inhibir la ruta metabólica de algunos metabolitos secundarios (Martin & Aharonowitz., 1982).

La temperatura es otro factor importante en el desarrollo de los hongos que está involucrado directamente con el crecimiento, esto se observó en las experiencias realizadas, cuando se empleó cáscara de papa y glucosa como fuente de carbono, se observó que: a una temperatura de 4 °C, el crecimiento tanto de hifas y conidias se inició a los 14 días; en cuanto a la temperatura de 37 °C, se observó un efecto similar debido a que se observó crecimiento sobre el medio el día decimo; en cambio a 22 °C, las características de crecimiento del hongo fueron claramente distinguibles, ya que en las fuentes de carbono de filtrado de papa y cáscara de papa se observó un crecimiento acelerado en especial en los pH 4 y 5; en contraste con el aserrín, a pesar de que a esta temperatura sí hubo crecimiento, solo se observó una delgada capa de hifas incolora, este fenómeno también se observó tardíamente, cuando se empleó aserrín como fuente de carbono a temperaturas de 4°C y 37 °C.

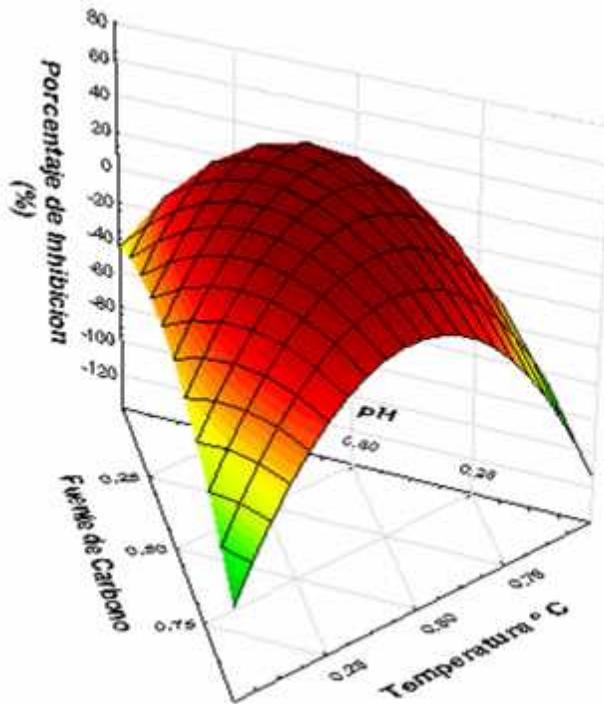


Figura 17. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto del fermento de *T. inhamatum*, producido a diferentes: fuentes de carbono, temperatura y pH, (IIFB – 2008).

9.5 Actividad enzimática del hongo antagonista y patógeno.

9.5.1 Evaluación cualitativa de la producción enzimática de *T. inhamatum* y *B. fabae* en medios de cultivo específicos.

Para la detección de la actividad enzimática de *T. inhamatum* y *B. fabae* se empleó medios selectivos, en los cuales la secreción de una determinada enzima, era necesaria para la asimilación del nutriente y de esta manera el hongo pueda presentar crecimiento. Para este efecto se emplearon medios que estaban compuestos por fosfatos, sales de magnesio y el sustrato del que se quería establecer si podía ser asimilado por los hongos. Para el reporte de los resultados, se observó esencialmente la decoloración del medio respecto el control, esto luego de la adición del indicador respectivo. Los resultados del análisis cualitativo se expresan en la siguiente tabla,

Tabla 16. Resultados del análisis cualitativo de la actividad enzimática de *T. inhamatum* - *B. fabae*, (IIFB – 2008).

Actividad enzimática buscada	Indicador empleado	Coloración del medio control	Actividad de <i>T. inhamatum</i>	Actividad de <i>B. fabae</i>
Amilolítica	Lugol	Violeta	+	+
Celulolítica	Rojo kongo	Rojo	+/-	+/-
Pectinolítica	Azul de bromotimol	Naranja	+	-
Proteolítica	Azul de bromotimol	Amarillo	+	+/-
Quitinolítica	Azul de bromotimol	Verde	+/-	+/-
Xilanolítica	Azul de bromotimol	Verde	+/-	-
Lipolítica	Rojo fenol	Amarillo	-	-

Clasificación: - Sin cambio respecto el control
 +/- Ligero viraje del indicador respecto control
 + Completo viraje del indicador respecto el control

En tabla de resultados se puede observar que el hongo *T. inhamatum*, presenta al menos seis de las siete actividades enzimáticas investigadas, la única actividad que no se pudo detectar fue la actividad lipolítica, no obstante el resultado obtenido para la actividad lipolítica no es una aseveración confirmada verazmente, pues se ha reportado que: especies de *Trichoderma spp.*, presentan esta actividad enzimática, quizá este fenómeno se debió, a que el método empleado para su detección, no presenta la sensibilidad requerida, o también se puede atribuir este resultado a que la fuente de carbono o nitrógeno no son las requeridas para la producción de esta enzima (Razak et al.,1994; Coca et al., 2001). En cuanto a la detección de la actividad

enzimática del hongo patógeno, esta presenta al menos cuatro de las siete actividades enzimáticas realizadas.

La importancia de este estudio radica, en que al margen de existir los mecanismos de: inhibición por productos del metabolismo secundario y el micoparasitismo por parte de los hongos controladores (Woo et al, 2006), esta también presente, el mecanismo enzimático, que es el principal aspecto que característico de los hongos del genero *Trichoderma* (Harman & Kubicek, 1998; Harman et al., 2004) que es crucial en el control de los hongos catalogados como patógenos. En tal razón se evaluó la actividad enzimática cualitativa y cuantitativa de *T. inhamatum*. Esta evaluación no es un screening completo del perfil enzimático del hongo, solo que para este análisis, se tomo en cuenta las macromoléculas características en la estructura de los hongos.

9.5.2 Evaluación cuantitativa de la producción enzimática de *T. inhamatum* en medio PDC

Para el análisis enzimático cuantitativo, se tomo en cuenta los resultados del screening cualitativo. En esta prueba se emplearon los medios de cultivo en batch que fueron sometidos: agitación – aeración, agitación, aeración y estanco. En las graficas que a continuación se detallan, se analizaron las actividades enzimáticas, respecto las variables físicas y el tiempo (7,14, 21, 28).

9.5.2.1 Actividad Celulolítica

En el análisis de la producción de la actividad glucolítica, podemos observar en la figura 18, que las variables físicas adoptadas en el presente estudio, influyen en la producción de enzimas con capacidad celulolítica.

La variable de estudio agitación – aeración, presenta en el mejor resultado al cabo de 7 días de iniciada la experimentación, con una actividad enzimática de 78.70 UI/L, en la segunda evaluación (día 14), esta actividad disminuye a 60.64 UI/L, pero en las dos ultimas evaluaciones, esta actividad enzimática va en aumento, el cual presenta un trayecto ascendente y progresivo con un valor de 76.15 UI/L y 100.69 UI/L respectivamente, en comparación con el medio de cultivo en estanco.

Con relación a las variables aeración, agitación, estas presentan resultados similares al

obtenido por el medio en estanco.

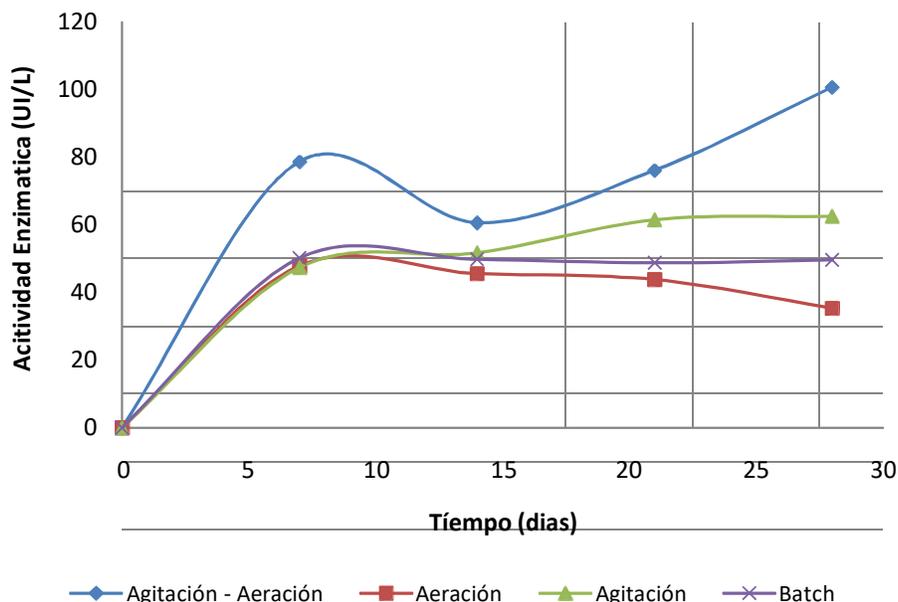


Figura 18 Actividad enzimática celulolítica de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, medida en medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y batch, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).

Para la asimilación de los nutrientes del medio, es necesaria la producción enzimática, las cuales el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular en pequeñas cantidades, que inician la hidrólisis del sustrato (Gong, 1979).

Las celulasas son producidas por una gran variedad de microorganismos entre los que se encuentran hongos y bacterias, la mayoría de los microorganismos celulolíticos, son capaces de producir celulasas. Esta característica, es bien aprovechada por hongos patógenos, ya que gracias a esta actividad, los hongos llegan a colonizar la superficie de las plantas ocasionando necrosis y posterior muerte.

9.5.2.2 Actividad Xilanolítica.

Después de la celulosa el xilano es el hidrato de carbono mas extendido cuantitativamente en la naturaleza. Su función en la planta es la de sustancia de reserva. En la figura 19 se puede observar que, el mejor resultado obtenido para esta actividad, fue bajo el parámetro de aeración - agitación, que a los 7 días presenta la mejor actividad de 69.22 UI/L, decreciendo esta en las dos mediciones subsecuentes a 45.87 UI/L y 45.45 UI/L, pero en el último análisis de esta actividad se observa como nuevamente se incrementa llegando a 62.14 UI/L. En

cuanto a los demás parámetros no se observa actividad relevante respecto al control (medio en estanco).

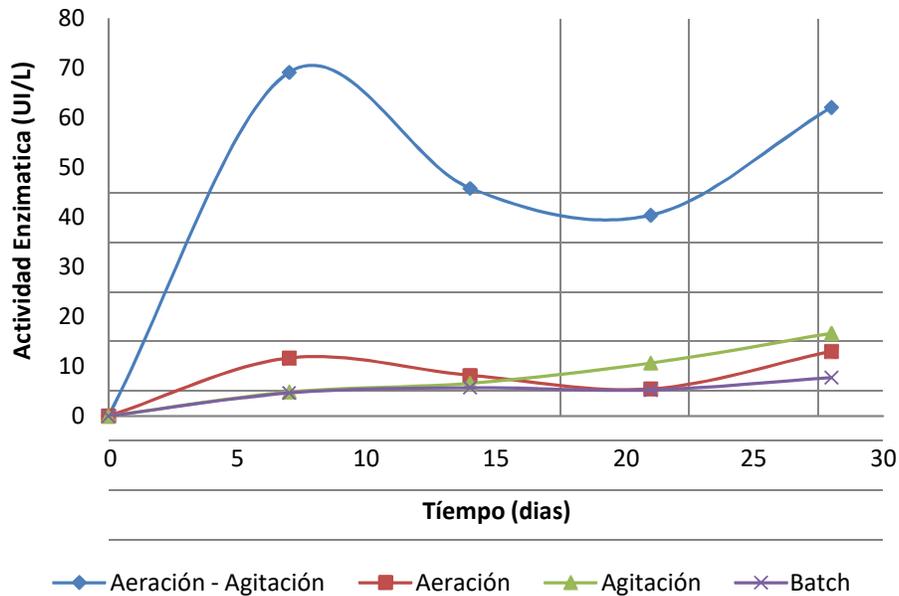
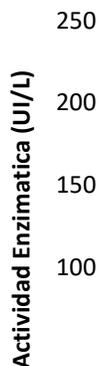


Figura 19 Actividad enzimática xilanolítica de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, medida en los medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y batch, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).

9.5.2.3 Actividad Amilolítica

El almidón constituye el producto de reserva predominante en las plantas. La mejor actividad amilolítica encontrada en esta prueba fue bajo el parámetro aeración, ya que a los 14 días presentó la actividad mas alta de la prueba con 183.33 UI/L, seguida del parámetro estanco, que presenta una línea ascendente a partir del día séptimo hasta el vigésimo primero, en el cual alcanza su pico máximo con una actividad de 175.85 UI/L, posteriormente esta actividad va en descenso; otro parámetro que presentó una actividad interesante fue le medio sometido en agitación – aeración, que alcanza su máxima actividad al séptimo día con 175 UI/L de actividad, que posteriormente va en descenso, como se observa en la grafica 20.



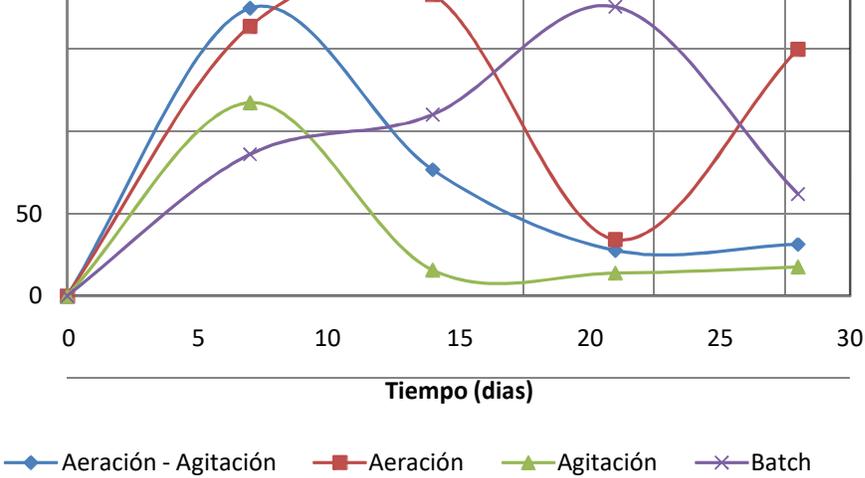


Figura 20 Actividad enzimática amilolítica de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, medida en los medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y batch, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).

9.5.2.4 Actividad Pectinolítica

Los polisacáridos de la pared celular de la plantas son los compuesto orgánicos mas abundantes de la naturaleza. La pared celular de los materiales cítricos esta conformada en su mayoría por tres polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y pectina (Vries & Visser 2001).La pectina forma parte de la pared celular primaria y su función es la de estabilizar las microfibrillas de celulosa, así como a otros polímeros y proteínas (Annis & Goewwin 1997).

Respecto a la actividad encontrada podemos observar que el parámetro aeración, presenta la mejor actividad a los 12 días con una actividad de 12.41 UI/L, seguida del parámetro aeración – agitación con 11.68 UI/L, en cuanto al cultivo en estanco, este presenta su mayor actividad el vigésimo primer día con 10.09 UI/L, que posteriormente decrece.

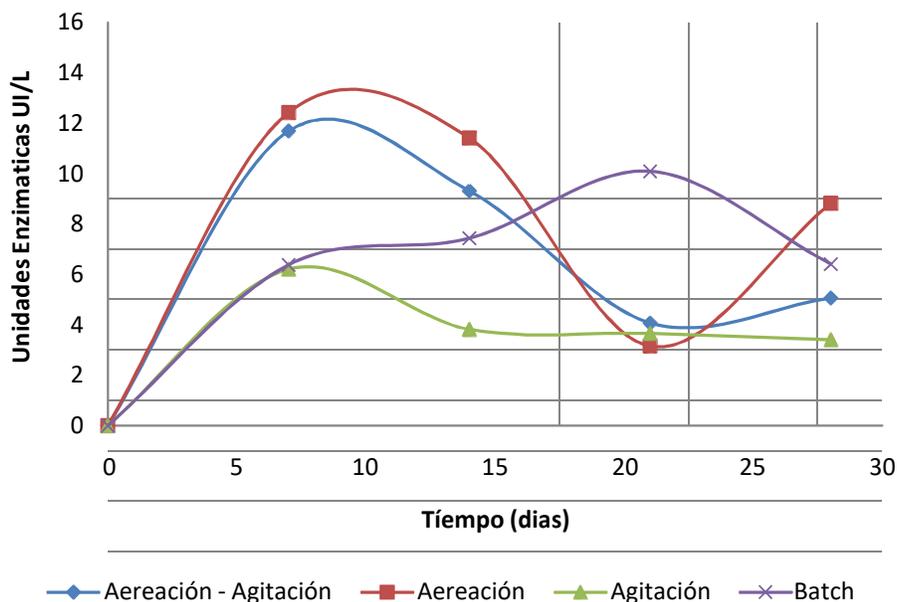


Figura 21 Actividad enzimática pectinolítica de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, medida en los medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y batch, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).

9.5.2.5 Actividad Quitinolítica

La mayoría de los hongos en su pared celular contienen quitina y la disolución o daño de este polímero estructural, tiene efectos adversos sobre el desarrollo y diferenciación de tales hongos; en particular, la pared celular (Inbar & Chet 1997). La quitina en la pared celular del hongo se presenta como una capa microfibrilar primaria o como un complejo interior de capas con glucanos y proteínas (Benhamou & Chet). El ataque microbiano de la quitina se realiza por enzimas extracelulares. La degradación se realiza por un ataque simultáneo de la quitinasa en muchos puntos a lo largo del polímero, resultando como producto pequeñas cantidades de N-acetilglucosamina.

La actividad quitinolítica, tiene como mejor resultado al parámetro agitación con una actividad que alcanza su máximo pico el día 21 con 294 mmol/L mg de N-acetilglucosamina, de igual manera el parámetro aeración alcanzo su mayor actividad el día 21 con 254 mmol/L mg de N-acetilglucosamina, pero posteriormente este decrece; en cuanto al medio agitación – aeración, este presenta una menor actividad respecto el medio batch.

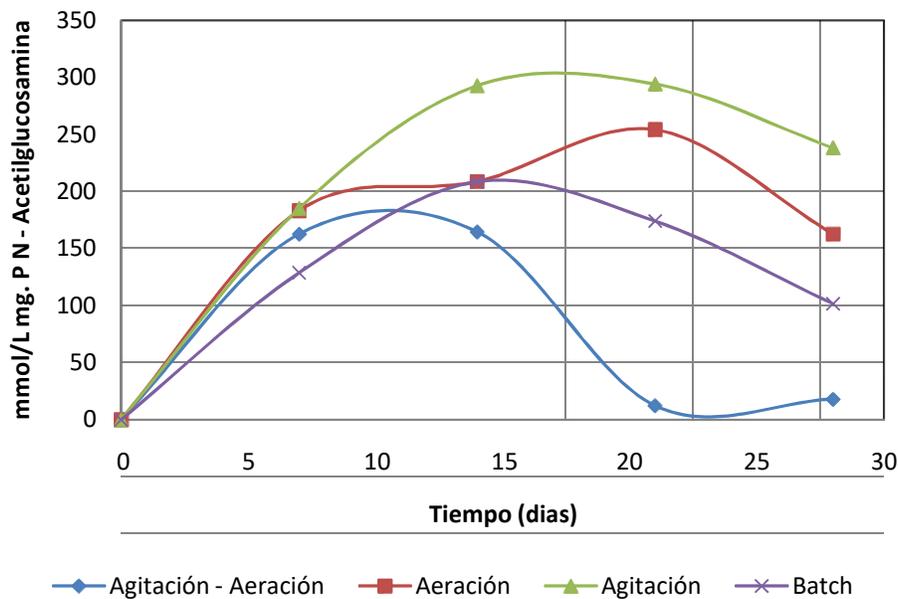


Figura 22. Actividad enzimática pectinolítica de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, medida en los medios de cultivo en batch bajo: agitación – aeración, aeración, agitación y batch, en un lapso de 28 días, (IIFB – 2008).

9.6 Comparación de la actividad del fermento 12 QD respecto otros controladores biológicos en parcelas de haba (Prueba de campo)

Esta prueba se realizó en la comunidad Chua Cocani, sobre un superficie aproximada de 896 m², mediante esta prueba se evaluó actividad controladora de *T. inhamatum* BOL – 12 QD sobre *B. fabae*, comparando su eficacia respecto otros controladores biológicos. La distribución del terreno y el orden en que se aplicaron los tratamientos se explica en la grafica 4.

9.6.1 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre la altura de las plántulas de haba

Tabla 17. Evaluación de la altura de 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Altura de plántula de haba (cm)				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana *	143,00	159,00	214,44	155,22	138,56
Isla de Sol *	138,33	144,33	154,33	151,78	138,22

* Datos expresados en promedios

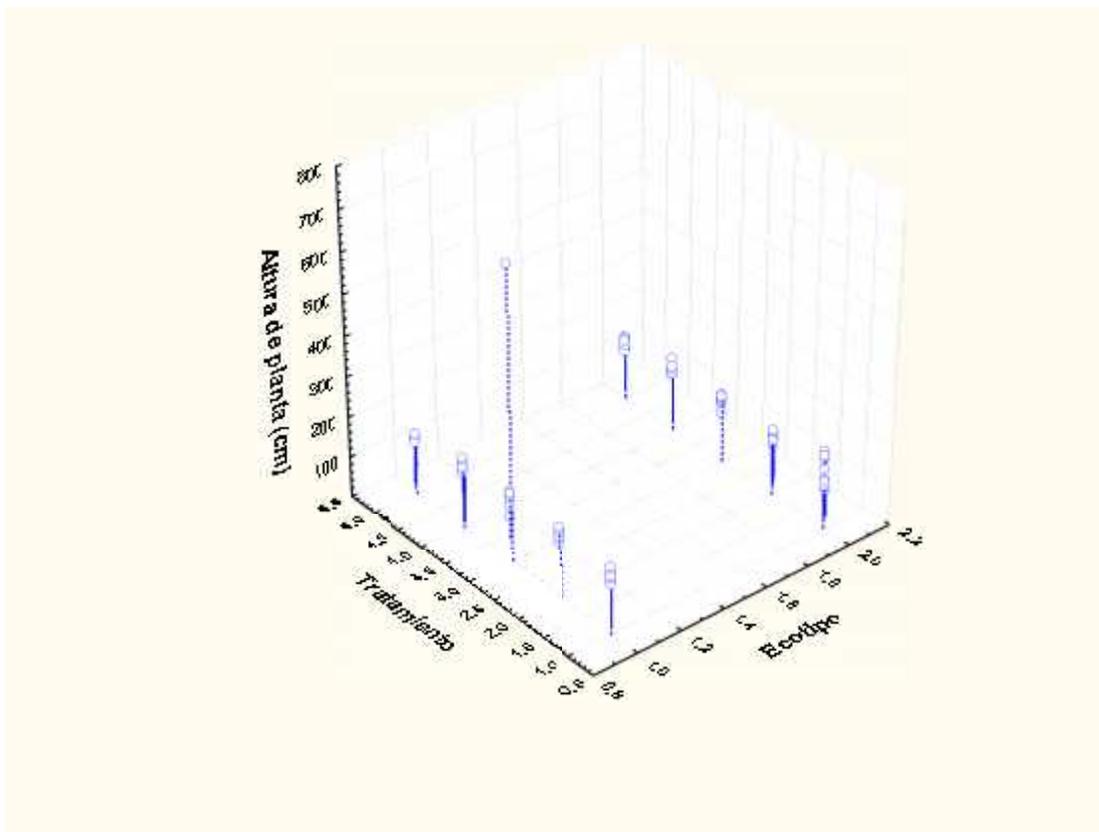


Figura 23. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: *T. inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma* spp) sobre la altura de las plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Altura plántula (cm); versus; Ecotipo y Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	6233	6233,34	1,64	0,204
Tratamiento	4	24305	6076,25	1,60	0,184
Interacción	4	11147	2786,65	0,73	0,573
Error	80	304621	3807,76		
Total	89	346306			

Si bien existe una marcada diferencia en la altura de la variedad Gigante Copacabana con el tratamiento de biosulfocal, para un nivel de confianza de ($p < 0.05$), esta impresión, no tiene significancia alguna respecto al tratamiento y el ecotipo de haba. De igual manera en la variedad Isla del Sol el cuadro no es diferente mas al contrario, a diferencia del anterior caso en esta variedad se observa que las alturas no varían en más de diez cm, siendo las medias similares respecto al testigo (sin tratamiento), esto se puede observar en la figura 23.

Por tal razón podemos establecer que ni el ecotipo y ni el tratamiento, influyen sobre la altura de las plántulas de haba.

9.6.2 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de plántula de haba

Tabla 18. Evaluación del peso de 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Peso de plántula de haba (g)				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana *	630,00	1.048,78	982,11	1.277,11	981,78
Isla de Sol *	521,44	1.164,78	723,24	861,89	938,89

* Datos expresados en promedios

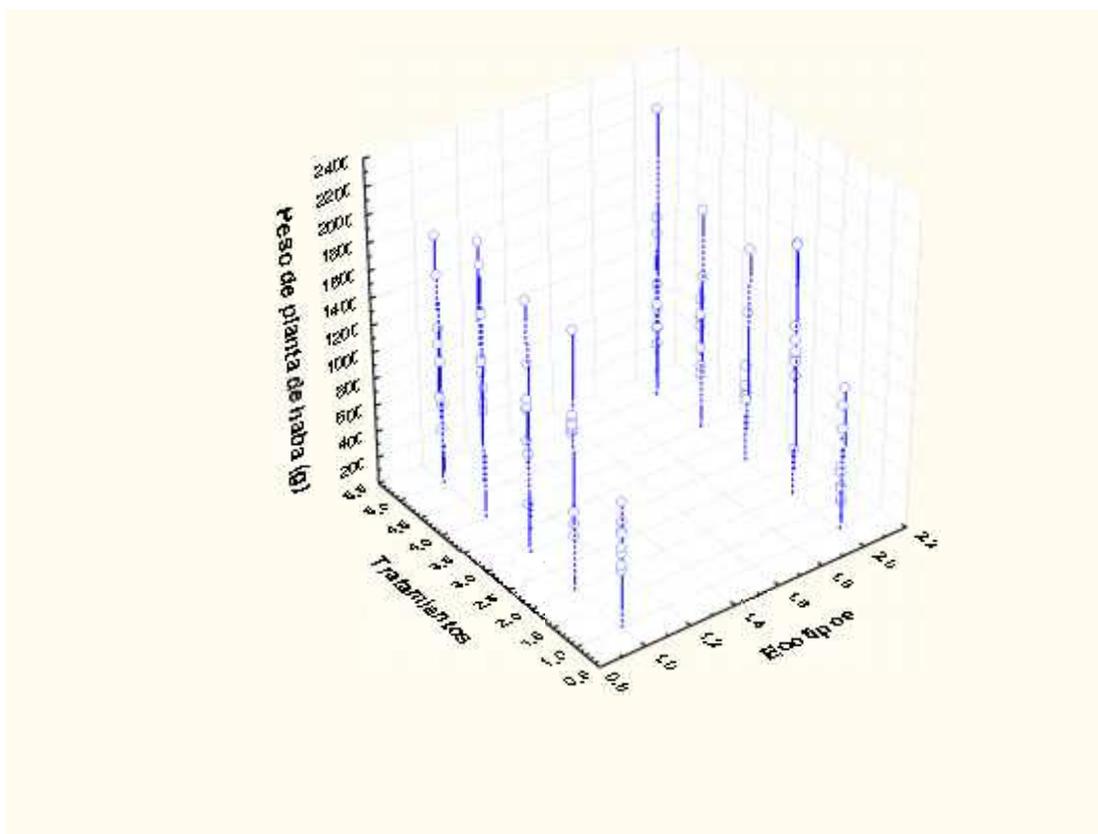


Figura 24. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: *T. inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma* spp) sobre el peso de plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Peso de plántula (g); versus Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	456933	456933	2,49	0,118
Tratamiento	4	3259765	814941	4,45	0,003
Interacción	4	739231	184808	1,01	0,408
Error	80	14661960	183274		
Total	89	19117889			

En lo que respecta al peso de las plántulas de haba, no se encontró interacción alguna, pero respecto al tratamiento se puede observar que existe un resultado significativo ($p < 0.05$). El mayor peso reportado en la variedad Gigante Copacabana, con el tratamiento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD con 1,277 g, seguido del tratamiento con Tricobio (tabla 18); En la variedad Isla del Sol el mayor peso fue obtenido por el tratamiento con Tricobio, seguido del tratamiento con esporas de *T. inhamatum spp* (tabla 18).

9.6.3 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el número de ramas en plántula de haba

Tabla 19. Evaluación del número de ramas en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Número de ramas en plántula de haba				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocel	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana*	4,00	4,44	4,44	4,67	4,22
Isla de Sol*	4,22	6,33	3,89	4,56	5,11

* Datos expresados en promedios

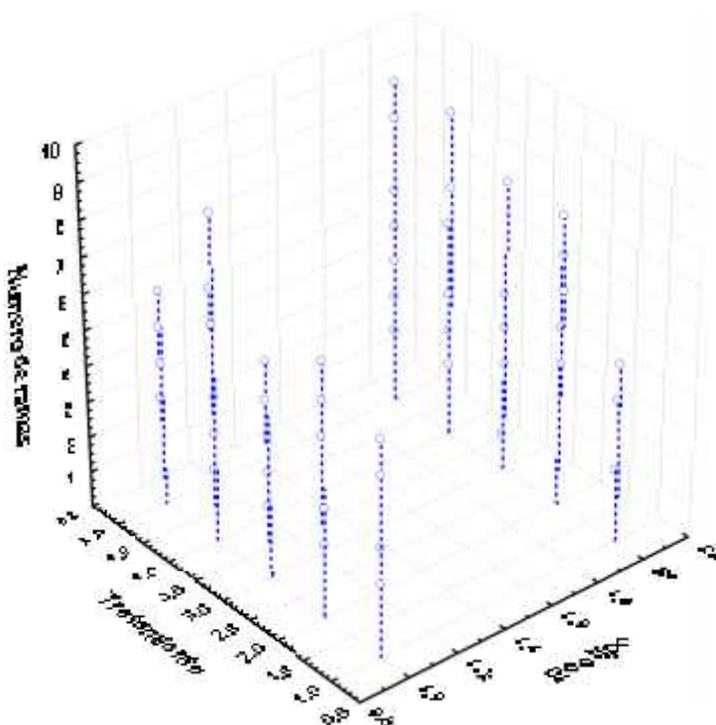


Figura 25. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocel, 4: *T. inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma spp*), sobre el número de ramas de plántulas de haba, (IIFB – 2009).

Two-way ANOVA: Número de ramas; versus; Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	4,900	4,90000	1,61	0,208
Tratamiento	4	18,956	4,73889	1,56	0,194
Interacción	4	16,378	4,09444	1,34	0,261
Error	80	243,556	3,04444		
Total	89	283,789			

En el análisis del número de ramas, podemos observar que los resultados, presentan una mayor dispersión como se observa en la grafica 25, pero a pesar de eso, no se puede catalogar a estos resultados como estadísticamente significativos, debido a que las medias aritméticas en todos los grupos son similares.

9.6.4 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre la longitud de vaina en plántula de haba

Tabla 20. Evaluación de la longitud de vaina de 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Longitud de vaina de haba (cm)				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	Trichoderma CBBA
Gigante Copacabana *	13,11	12,89	12	13,44	13,44
Isla de Sol *	11,12	12,39	13,06	13,56	12,67

* Datos expresados en promedios

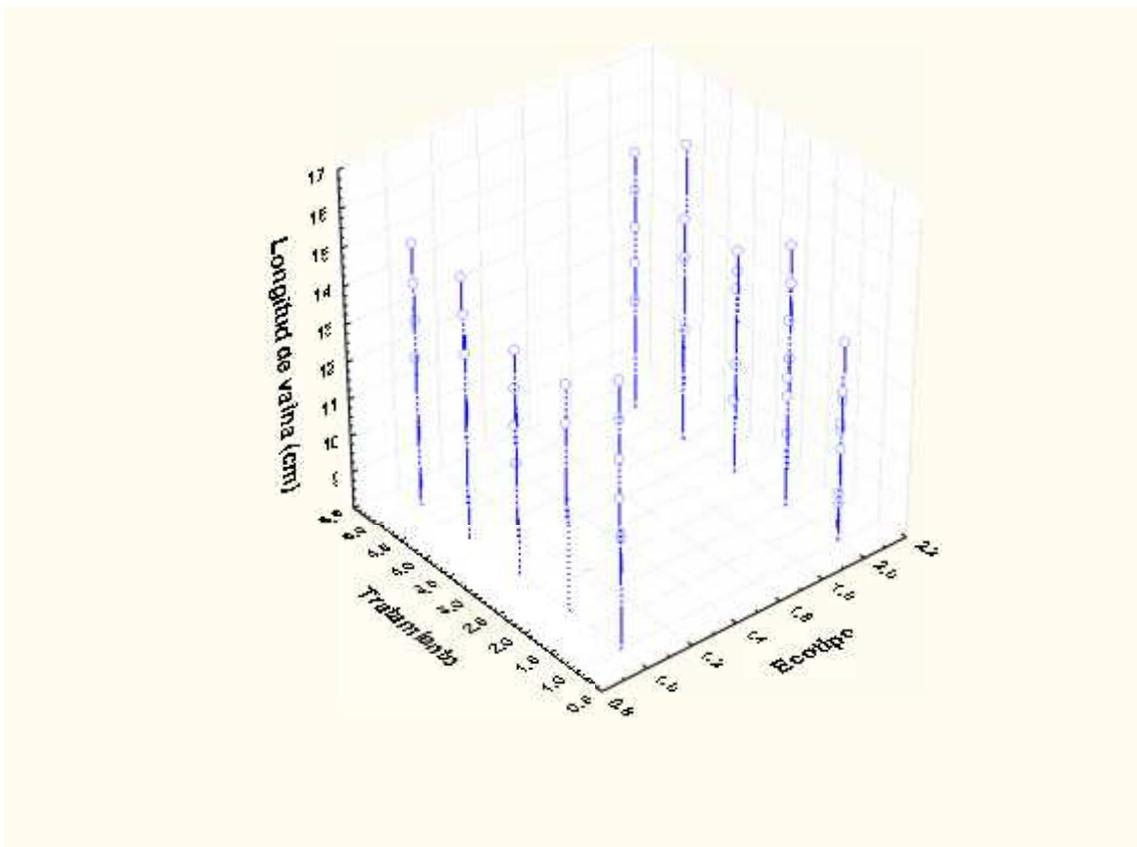


Figura 26. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: *T. inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma* spp), sobre la longitud de vainas por plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Longitud de vaina (cm); versus; Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	3,990	3,99003	2,37	0,127
Tratamiento	4	20,173	5,04336	3,00	0,023
Interacción	4	22,827	5,70669	3,39	0,013
Error	80	134,526	1,68157		
Total	89	181,516			

En el análisis de la longitud de vaina en plántulas de haba, se puede observar que si existe un predominio significativo ($p < 0.05$) respecto el tratamiento, pero según el ecotipo no se reporta mayor significancia.

El tratamiento que presentó una mayor longitud en vaina en el ecotipo Gigante Copacabana fue de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, del mismo modo en la variedad Isla del Sol este tratamiento presentó el mejor resultado en longitud de vaina- El control (testigo) presentó un longitud muy interesante con el ecotipo Isla de Sol, pues sobrepaso al tratamiento tanto de esporas de *Trichoderma* como al tratamiento con Tricobio. Sin embargo respecto al ecotipo Gigante Copacabana, el tratamiento testigo presentó un resultado inferior al obtenido en el anterior

ecotipo (tabla).

9.6.5 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre número de vainas en plántula de haba

Tabla 21. Evaluación del número de vaina en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Número de vainas de haba				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana *	19,56	30,44	31	38,11	35,56
Isla de Sol *	21,22	31,89	20,78	2189	27,56

* Datos expresados en promedios

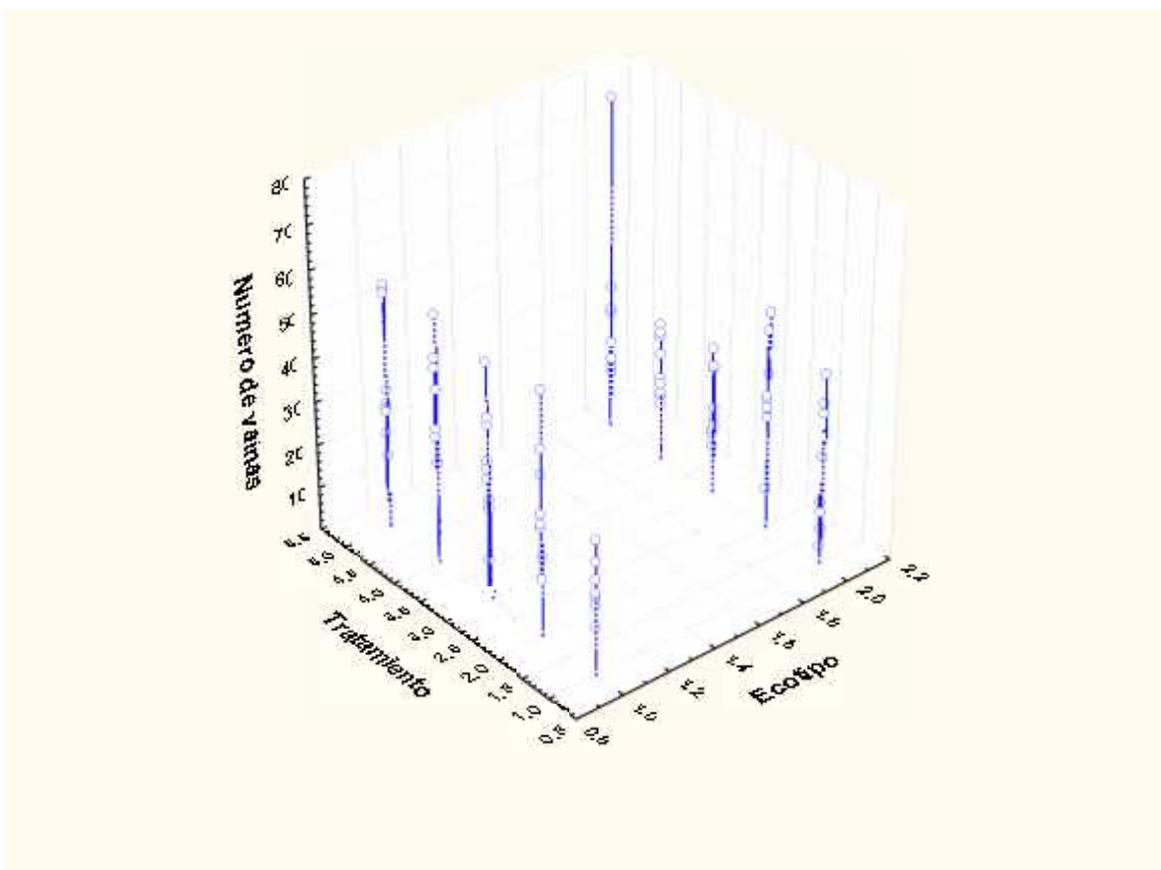


Figura 27. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: *T. inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma* spp), sobre el número vainas de plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Número de vaina; versus; Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	883,6	883,600	5,56	0,021
Tratamiento	4	1599,4	399,850	2,52	0,048
Interacción	4	1080,7	270,183	1,70	0,158
Error	80	12716,7	158,958		
Total	89	16280,4			

Respecto al número de vainas, este se halla influenciando significativamente ($p < 0.05$) tanto por el ecotipo como por los tratamientos aplicados.

La mejor producción reportada fue en la variedad Gigante Copacabana con el tratamiento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD. En el ecotipo isla del sol el mejor tratamiento se detecto con la aplicación del controlador Tricobio.

En este caso el número de vainas no necesariamente esta ligado con la producción, debido a que este no es un indicador de producción, muchas veces estas vainas, solo pueden contener entre uno a tres granos, este fenómeno se observó en la realización de la experiencia.

9.6.6 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de vaina por plántula de haba

Tabla 22. Evaluación del peso de vainas en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Peso de vainas de haba (g)				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana	308	574,78	550,22	724,89	619,44
Isla de Sol	318,67	578,33	376,51	466,44	455,89

* Datos expresados en promedios

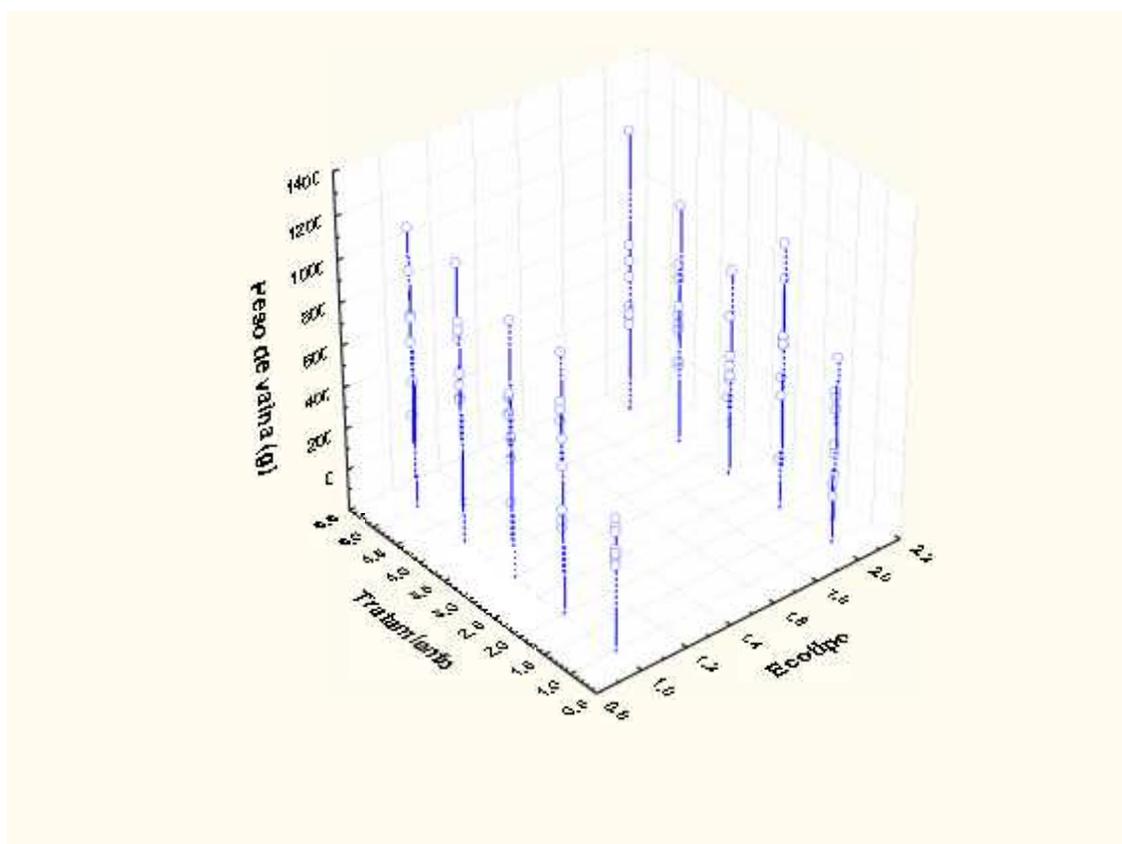


Figura 28. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: *T. inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma* spp), sobre el peso de vainas de plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Peso vaina (g); versus; Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	304316	304316	5,15	0,026
Tratamiento	4	946478	236620	4,01	0,005
Interacción	4	252990	63248	1,07	0,376
Error	80	4722733	59034		
Total	89	6226517			

El peso de vaina se ve influenciado significativamente ($p < 0.05$), tanto por el tratamiento aplicado como por el ecotipo de haba.

Se puede observar que el tratamiento con *T. inhamatum* BOL 12 – QD en el ecotipo Gigante Copacabana, presenta el mejor resultado respecto al peso; La variedad Isla del sol, presenta el mejor resultados con el tratamiento de Tricobio, si bien este resultado es el mejor obtenido en este ecotipo, no supera el peso obtenido por el Tratamiento de *T. inhamatum* BOL 12 – QD en el ecotipo Gigante Copacabana.

9.6.7 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el número de grano verde por plántula de haba

Tabla 23. Evaluación del número de grano verde en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Número de grano verde por plántula de haba				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana *	36,89	66,11	64	74,44	63,44
Isla de Sol *	32,44	64,44	40,78	191,44	47,78

* Datos expresados en promedios

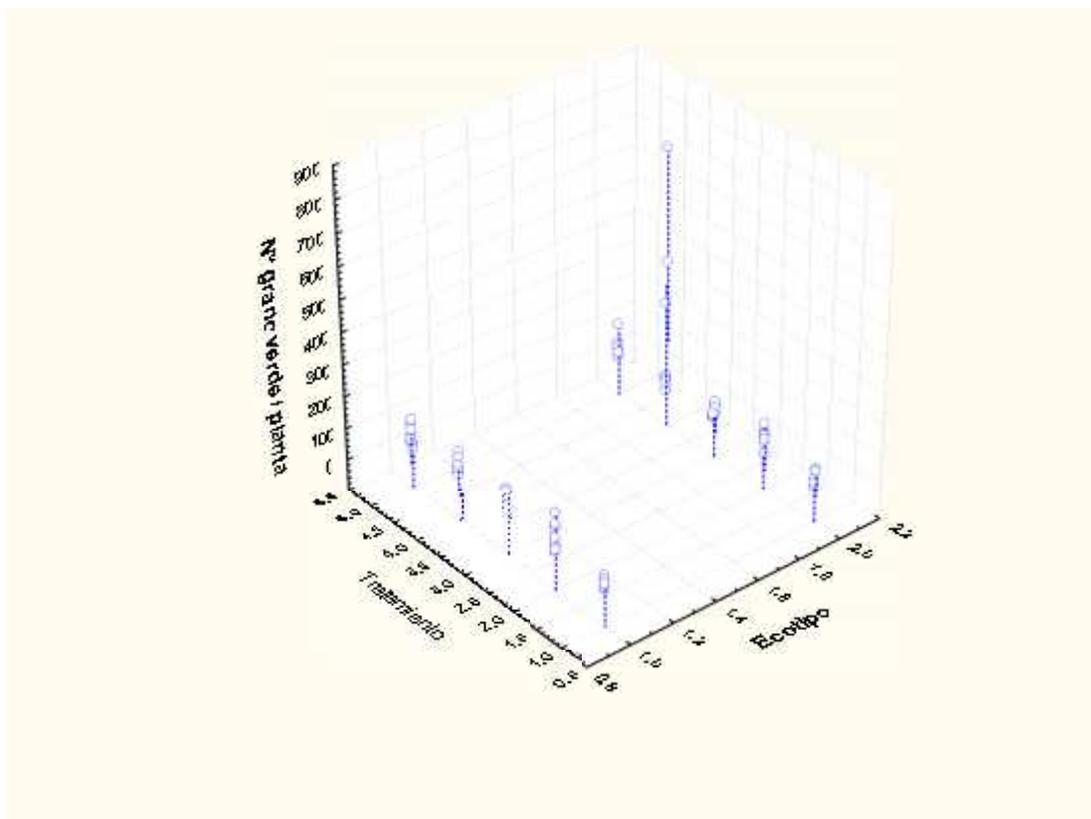


Figura 29. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: *T. inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma* spp), sobre el número de grano verde por plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Número de grano; verde; versus Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	4666	4665,6	0,64	0,427
Tratamiento	4	103200	25800,0	3,52	0,011
Interacción	4	60568	15141,9	2,07	0,093
Error	80	586474	7330,9		
Total	89	754907			

El número de grano verde por plántula de haba, ve influenciado estadísticamente (p < 0.05) solo por el tratamiento.

El tratamiento con *T. inhamatum* BOL – 12 QD, presentó el mejor número de grano verde de haba, tanto en la variedad Gigante Copacabana como en la variedad Isla del Sol, obteniendo esta ultima el mejor resultado reportado en este experimento, ya que supera ampliamente al segundo de la prueba, que este caso pertenece al ecotipo Gigante Copacabana, bajo el tratamiento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD.

9.6.8 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de grano verde por plántula de haba

Tabla 24. Evaluación del peso de grano verde en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Peso de grano verde por plántula de haba				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	Trichoderma CBBA
Gigante Copacabana *	132,98	243,31	224,08	311,58	258,5
Isla de Sol *	125,67	254,56	136,89	195,33	179,11

* Datos expresados en promedios

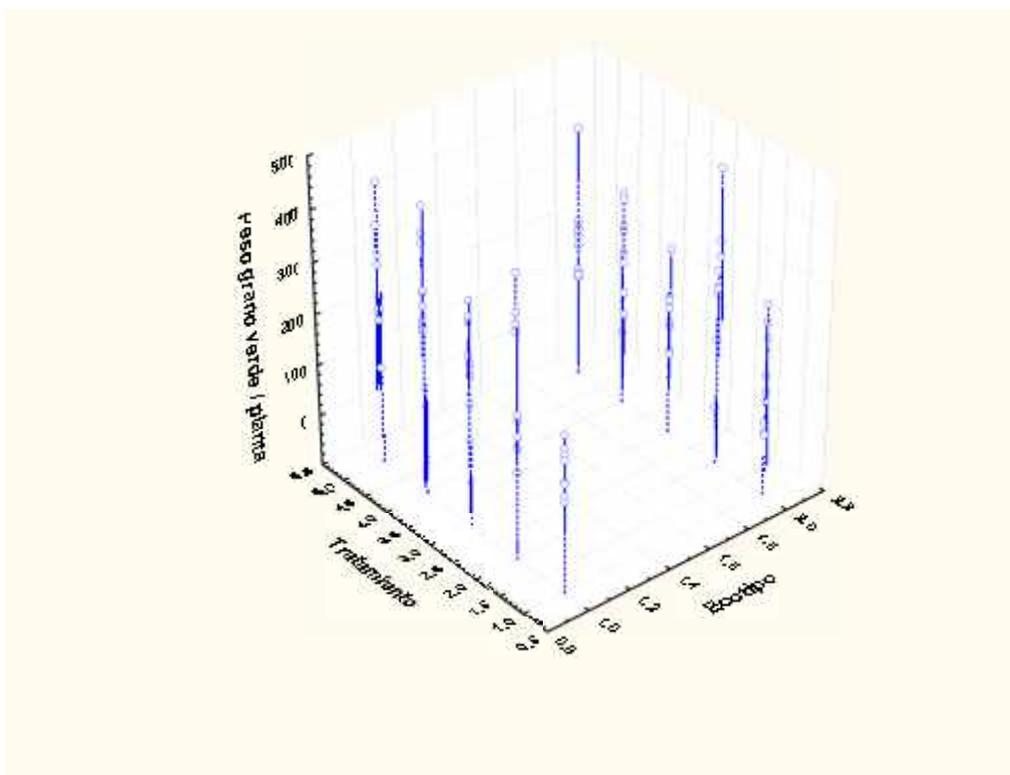


Figura 30. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: *T. inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma* spp), sobre el peso de grano verde por plántulas de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Peso grano verde/plántula; versus; Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	73046	73045,5	7,82	0,006
Tratamiento	4	192982	48245,5	5,17	0,001
Interacción	4	55591	13897,7	1,49	0,213
Error	80	746907	9336,3		
Total	89	1068525			

En lo concerniente al peso de grano verde por plántula de haba, este presenta un resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$), tanto para el tratamiento como los ecotipos.

T. inhamatum BOL – 12 QD, presenta el mejor resultado respecto al peso de grano verde en el ecotipo Gigante Copacabana, seguida del controlador Tricobio; En la variedad Isla del Sol, el tratamiento con Tricobio presenta el mejor peso reportado seguido del fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD.

En esta prueba, se observó una relación directamente proporcional entre: número de vainas, peso de vainas y peso de grano verde, debido a que en los resultados anteriores, en la variedad Gigante Copacabana el tratamiento con *T. inhamatum* BOL – 12 QD presentó el mejor resultado, respecto los tratamientos..

9.6.9 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el peso de grano seco por plántula de de haba

Tabla 25. Evaluación del peso de grano seco en 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (135 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Peso de grano seco por plántula de haba				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana *	49,86	84,92	77,2	106,33	96,38
Isla de Sol *	34,63	90,82	56,18	72,23	53,67

* Datos expresados en promedios

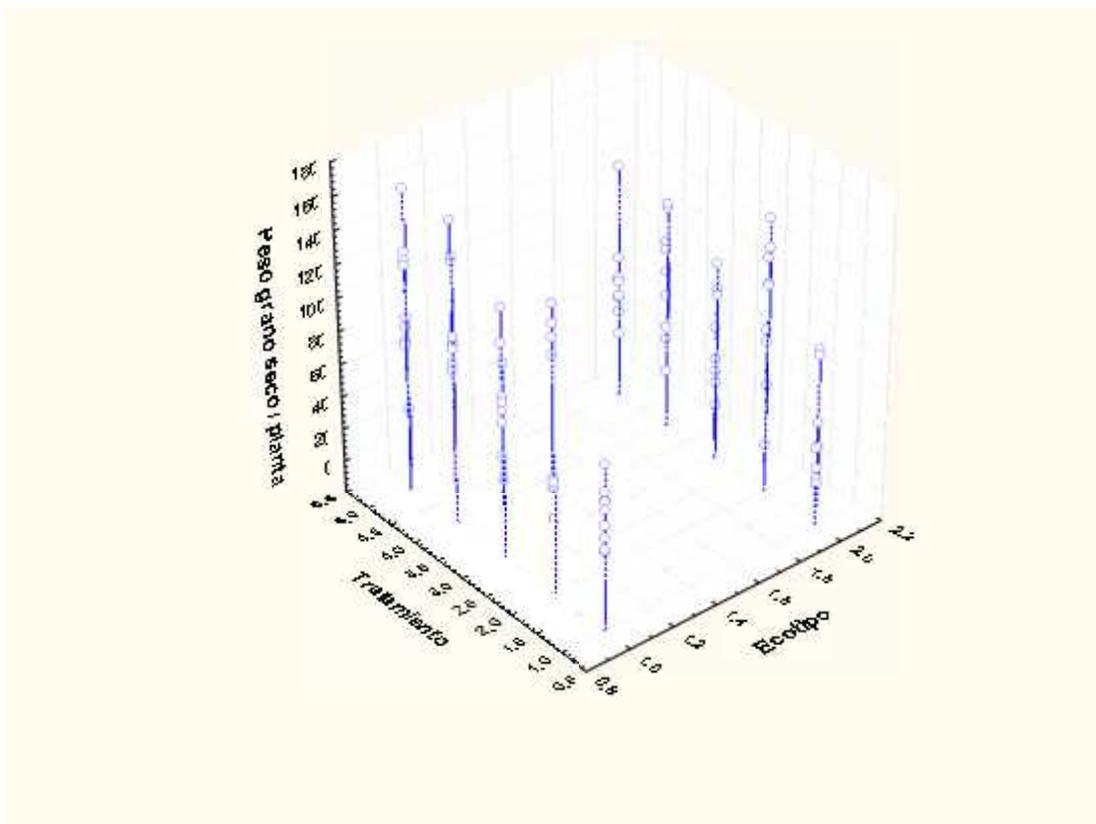


Figura 31. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana , 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma spp*) sobre el peso de grano seco por plántula de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: peso grano seco/plántula versus Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	10334	10334,1	8,30	0,005
Tratamiento	4	26516	6629,1	5,33	0,001
Interacción	4	6296	1573,9	1,26	0,291
Error	80	99569	1244,6		
Total	89	142715			

Para obtención del peso de grano seco, se procedió a deshidrata el grano verde de haba en una mufla de calentamiento por un lapso de 12 horas, a una temperatura de 40 °C, el resultado del grano seco se ve afectado ($p < 0.05$), tanto por el ecotipo empleado como por el tratamiento.

En la variedad Gigante Copacabana el mejor resultado en peso seco respecto el tratamiento fue del fermento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD seguido por tratamiento con Tricobio. La variedad Isla del Sol reporta como mejor resultado, al tratamiento al realizado por Tricobio, seguido por el fermento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD.

9.6.10 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el porcentaje de severidad por plántula de haba

Tabla 26. Evaluación del porcentaje de severidad por plántula de haba en 180 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Porcentaje de Severidad por plántula de haba (%)				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana*	19,44	14,56	18,33	14,44	13,89
Isla de Sol*	17,78	25,11	22,78	13,33	8,67

* Datos expresados en promedios

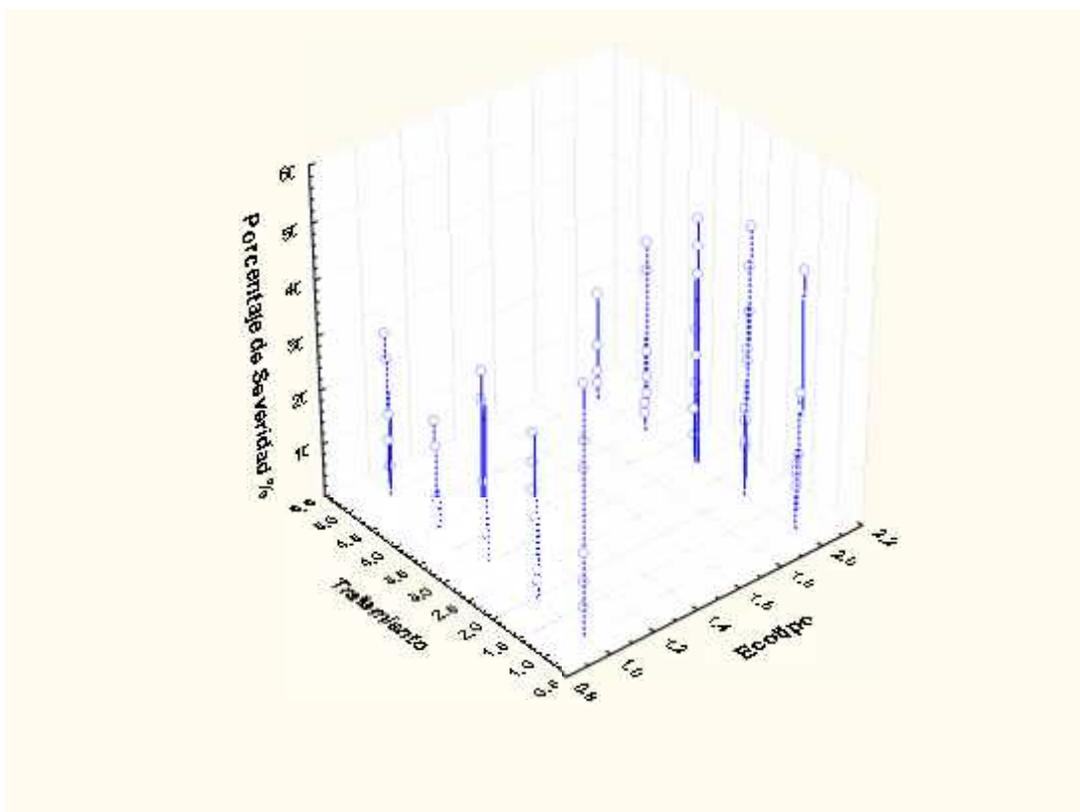


Figura 32. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana , 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: 12 – QD (*Trichoderma inhamatum*), 5: Esporas *Trichoderma spp*) sobre el porcentaje de severidad por plántula de haba, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Porcentaje de Severidad; versus; Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	44,1	44,100	0,34	0,562
Tratamiento	4	1179,9	294,972	2,26	0,070
Interacción	4	687,0	171,739	1,32	0,271
Error	80	10427,6	130,344		
Total	89	12338,5			

El porcentaje de severidad no presenta significancia alguna ($p < 0.05$) a la conclusión de de la madurez fisiológica, este aspecto puede deberse, a que, una vez iniciado el periodo de floración de la plántula de haba, se hace imposible el ingreso a la parcela de experimentación, pues al hacerlo, se ocasiona un deterioro en la producción, este aspecto se observó en una experimentación anterior, al realizar los primeras pruebas de la actividad del hongo *T. inhamatum* BOL – 12 QD respecto a fungicidas no orgánicos.

Los resultados encontrados establecen que la aplicación de esporas de *Trichoderma*, sobre las plántulas de haba, es un tratamiento eficaz en el control de la Mancha Chocolate, sin embargo, no debemos dejar de lado que estos son microorganismos ajenos al ecosistema del altiplano.

Respecto a la actividad de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, sobre el porcentaje de severidad, este tratamiento se encuentra como segunda mejor alternativa, pero a diferencia del tratamiento con esporas de *Trichoderma*, este es mas seguro, debido a que, lo que se aplica sobre las plántulas no es materia viva, sino, el producto originado por la fermentación de materia orgánica, producido por *T. inhamatum*

9.6.11 Efecto del ecotipo de haba y el tratamiento sobre el rendimiento de la parcela de estudio, a la conclusión del secado de las calchas.

Tabla 27. Evaluación del peso de grano seco por parcelas, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica y secado de las calchas (155 días), (Chua Cocani – 2009).

Ecotipo	Rendimiento total del grano seco (Kg/Ha)				
	Testigo	Tricobio	Biosulfocal	12 QD	<i>Trichoderma</i> CBBA
Gigante Copacabana	2.266,97	3.200,00	3.333,33	3.333,33	2.800,00
Isla de Sol	1.333,33	1.733,33	2.533,33	2.533,33	2.133,33

* Datos expresados en promedios

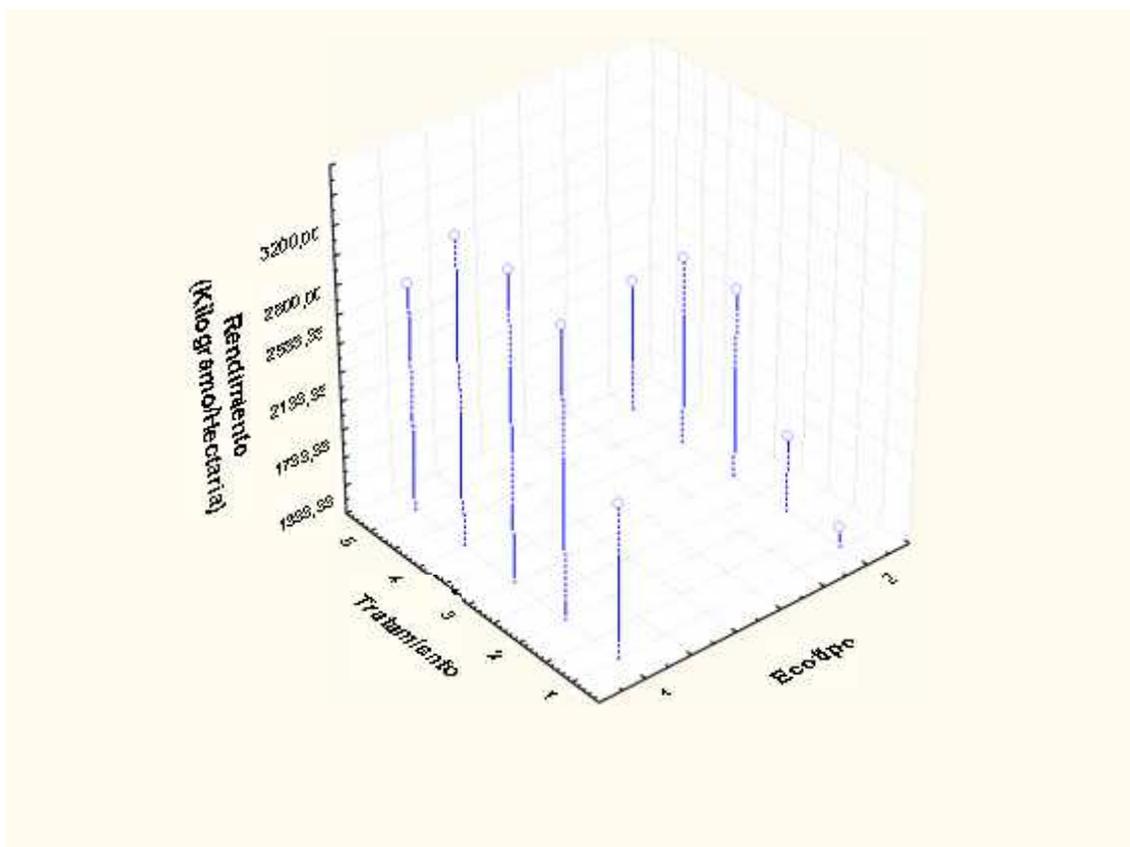


Figura 33. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio CBBA, 3: Biosulfocal, 4: *Trichoderma inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma spp*) sobre el rendimiento total de la parcela de estudio, (Chua Cocani – 2009).

Two-way ANOVA: Rendimiento; versus; Ecotipo. Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Ecotipo	1	2178070	2178070	44,55	0,003
Tratamiento	4	1731113	432778	8,85	0,029
Error	4	195556	48889		
Total	9	4104740			

En el rendimiento de la totalidad de la parcela de estudio, se puede observar que la existencia de significancia en el resultado ($p < 0.05$) respecto a los ecotipos y tratamientos.

Una de las observaciones más sobresalientes de estos resultados es que, en el análisis de unidades experimentales de haba, respecto al peso, el tratamiento con Tricobio en el ecotipo Isla del Sol presentaba el mejor rendimiento por unidad experimental con 90.82 g/plántula de haba, y respecto al ecotipo Gigante de Copacabana estaba como segundo mejor tratamiento con 84.92 g/plántula de haba. Pero al realizar el análisis del peso de la totalidad de la parcela de estudio, este es desplazado por el tratamiento por Biosulfocal, ya que los tratamientos con *T. inhamatum* BOL 12 QD y Biosulfocal, presentan los mejores

rendimientos de peso en grano seco ambos ecotipos con 3,333 Kg/Ha (Gigante Copacabana) y 2,533 Kg/Ha (Isla del Sol).

La comparación de los tratamientos respecto al porcentaje de severidad, muestra un resultado interesante, ya que, si bien el fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD, no es un producto, de expendio en el mercado, este ejerce un control similar, a los productos agroquímicos empleados en el tratamiento de plagas.

En lo concerniente a los resultados de: peso de plántula, longitud de vaina, número de vaina, peso de vaina, número de grano verde, peso de grano verde y peso de grano seco, esta claro el predominio de la actividad del fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD, puesto que en estas pruebas, este tratamiento presentó los mejores resultados.

Esta claro que el fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD, produce un efecto no solo de biocontrol por parte de los metabolitos activos, sino que también, las moléculas presentes en este medio participan como mediadores en la activación de factores relacionados con la respuesta inmune de la plántula y media ciertos factores de crecimiento (Yedidia et al., 2003; Hanson & Howell, 2004; Harmam et al., 2006), como se observa por los resultados obtenidos

El haba es un producto que puede ser usado tanto en grano verde como seco, si bien en los mercados este producto, se expendio mayormente como grano verde (en vaina), poco a poco va cobrando importancia el expendio de grano seco, puesto que gracias a iniciativas de los pequeños empresarios, este producto esta adoptando nuevas formas de expendio tal es el caso de la harina, sopa, pito y pan de haba, que poco a poco va insertándose en los supermercados como alternativa de consumo. En tal caso, los resultados obtenidos aportarían de manera sustancial, en la mejora de la producción del grano seco de haba, como en el cuidado del medio ambiente.

El haba, un tradicional alimento del altiplano, conquista un creciente prestigio internacional por sus extraordinarias propiedades nutritivas y constituye un producto de exportación altamente prometedor para Bolivia.

Algo muy importante a destacar, es que los productos ecológicos tienen un precio superior al de los productos convencionales que varían en relación directa con la oferta disponible, por lo que fomentar la producción, consumo y exportación de estos productos es una excelente alternativa para desarrollar y aprovechar más los mercados internacionales.

CAPITULO X

CONCLUSIONES

La influencia de los filtros de luz verde y lila, incrementan la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* BOL – 12 QD, sobre *Botrytis fabae*, en un 20 %.

Los parámetros físicos: aeración – agitación, aeración, agitación, influyen en el crecimiento y la actividad metabólica de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, debido a que, bajo los parámetros de aeración y agitación se encontró la mejor actividad inhibitoria en el crecimiento de *B. fabae* de 57.76 % y 61.11% respectivamente.

La adición de nitrato de amonio en los medios de cultivo de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, ejerce un efecto negativo en su capacidad controladora sobre *B. fabae*, ya que el porcentaje de inhibición solo alcanzo al 11 %.

El Co-cultivo de *T. inhamatum* BOL – 12 QD con *B. fabae*, mediante el uso esporas, presenta un porcentaje de inhibición del 51.21 %, cuando la concentración de *B. fabae* es de 10^2 prop/mL y *T. inhamatum* 10^6 prop/mL.

El uso de biomasa de *B. fabae* y esporas de *T. inhamatum* BOL – 12 Q, origino un porcentaje en la inhibición del crecimiento de *B. fabae*, mayor que cuando se empleo esporas; a 500 mg de Biomasa de *B. fabae* y 10^6 prop/mL de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, la inhibición fue del 55.11 %.

El empleo de cáscara de papa a una temperatura de 22 °C y pH 5, como medio de cultivo para *T. inhamatum* BOL – 12 Q, origino un 54.74 % de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*.

Las actividades enzimáticas encontradas para *T. inhamatum* BOL – 12 Q, fueron: celulolítica, xilanolítica, amilolítica, proteolítica, pectinolítica y quitinolítica; para *B. fabae* se encontró actividad: celulolítica, amilolítica, proteolítica y quitinolítica.

La mejor actividad enzimática: celulolítica se obtuvo, cuando el medio de cultivo fue sometido bajo el parámetro agitación – aeración con 100,69 UI/L a los 28 días; xilanolítica a los 7 días con 69,22 UI/L de actividad, bajo el parámetro agitación – aeración; amilolítica con 183,33UI/L de actividad a los 14 días, bajo el parámetro de aeración; pectinolítica con 12.41 UI/L a los 7 días, bajo el parámetro aeración; quitinolítica con 294 mmol/L mg N – acetilglucosamina a los

21 días, bajo el parámetro agitación.

La aplicación del fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD, sobre las plántulas de haba presentó significancia ($p < 0.05$) sobre las variables: peso de plántula, longitud de vaina, número de vaina, peso de vaina, número de grano, peso de grano verde y peso de grano seco.

El peso de grano seco obtenido por la aplicación de *T. inhamatum* BOL 12 QD, sobre la variedad Gigante Copacabana originó un rendimiento de 3,333 Kg/Ha de grano seco y en la variedad Isla del Sol 2,533 Kg/ Ha de grano seco, siendo estos los mejores registrado y significativos inclusive para un 99 % de confianza ($p < 0.01$).

CAPITULO XI

PROYECCIONES Y RECOMENDACIONES

Dentro de las perspectivas futuras que nos planteamos tenemos:

Continuar con la optimización del medio de cultivo de *T. Inhamatum* BOL 12 QD, de manera de incrementar la actividad inhibitoria contra *B. fabae*, para este efecto, pretendemos combinar las variables de temperatura, pH, filtro de luz, fuente de carbono y agitación, ya que estas variables influyen en la producción de metabolitos secundarios.

Identificar las moléculas con actividad biológica producidas por *T. Inhamatum* BOL 12 QD, mediante una Resonancia Magnética Nuclear y posteriormente cuantificar las mismas.

Aislar las enzimas producidas por *T. inhamatum* BOL 12 QD y realizar pruebas de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, trabajando bajo un diseño factorial.

Analizar la actividad nagasa, debido a que, se evidencio la presencia del pulgón negro (*Aphis fabae*) en los cultivos de haba, en tal razón, debería de iniciarse estudios relacionados con el control de insectos.

Detectar la actividad inhibitoria por metabolitos volátiles, ya que se podría establecer cual la influencia de estos sobre el crecimiento del patógeno y también podríamos cuantificar la producción.

Respecto a las aplicaciones realizadas en campo, sugerimos que se realice un pre tratamiento del suelo con fermento de 12 QD antes de la siembra del haba para establecer si este actividad es o no favorable con el control de la infección por *B. fabae*.

En la evaluación de la prueba de campo, uno de los factores que no se tomo en cuenta en este estudio, es que en las comunidades rurales, generalmente se realizan cultivos compartidos (papa, quinua, haba, etc), lo cual se recomienda tener en cuenta.

Una de las que perspectivas que se buscaba con este trabajo, era catalogar el haba como alimento orgánico, aspecto que se cumplió a cabalidad con este trabajo. Por tal razón, se debería de realizar nuevos estudios relacionados con la actividad controladora de *T. inhamatum* frente a otros patógenos en cultivos de importancia económica en nuestro país.

REFERENCIAS

- Agrios, G., (1996). Fitopatología segunda edición. Edición Limusa. México.
- Agrios, G., (2003). Fitopatología segunda edición. Edición Limusa. México.
- Aleu, J., & González, I., (2000). Biotransformation by *Botrytis* species. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz.
- Alexopoulos, C., 1966. Introducción a La Micología. 2a. Ed. Buenos Aires, Universitaria. 615p.
- Álvarez, T., & Terrazas, E., (2002). Manual para producción y valoración de enzimas microbianas con interés biotecnológico. IIFB, FCFB, UMSA. La Paz – Bolivia, p. 1 – 19.
- Apaza, L., Terrazas, E., Alvarez, T., & Gimenez, A., (2008). Optimización de parámetros físicos, químicos y biológicos del cultivo de *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD para una mejor producción de compuestos biológicamente activos contra *Botrytis cinérea*. Tesis de Maestría, IIFB, UMSA, La Paz – Bolivia.
- Auger, J., (1988). El problema de la pudrición gris, *Botrytis cinerea* Pers., en uva Publicaciones agrícolas. Santiago. U. de Chile. 15:1-15,
- Balderama, F., Iriarte, V., Barea, O., Iporre, G. y Carrasco, E., (2001). Cadena Agroalimentaria del Haba de Altura para Exportación. Cochabamba, Bolivia. pp 5.
- Bergmeyer, HU. (1984). Methods of enzymatic analysis, Enzymes: Peptidase, proteinases an their inhibitors Weinheim, Veriag Chamie, 340p.
- Benhamou, N., & Chet, I., (1993). Hyphal interactios between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultraestructure an gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopatology. 83, 1062 – 1071.
- Behmer C.& Demain A, (1983) Current Microbiol. 8, p107.
- Bennett, J., Dunn, J., & Goldsman C., (1981), Applicartion Enviromental and Microbiology. 41, p488.
- Bu'Lock, R., Detroy, Z., Hostalek, P., & Munim, A., (1974), Mycology. 62, p377.
- Castro, C., Navas, C., & Caro, O., (2000). Obtención de amilasas fúngicas a partir de *Aspergillus* sp. aislado de semillas de lenteja. Revista de Ingeniería tecnológica. Vol. 10, 17 – 14.
- Chambi, E., Alvarez, T., Terrazas, E., Gimenez, A., & Quispe, D., (2007). Optimización de las condiciones de cultivo adecuadas para la producción de biogás mediante la digestión anaerobia de la paja de quinua (*Chenopodium quinua willdenow*) y cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) como residuos agrícolas. Tesis Licenciatura. IIFB, UMSA, La Paz – Bolivia.

- Chet, I., Inbar, J., & Hadar, I., (1997). Fungal antagonists and mycoparasites. In: Wicklow, D.T., Soederstrom, B. (Eds.), *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*. Springer, Berlin, pp. 165–184.
- Ciancas, J., Alvarez, T., & Gimenez, A., (2006). Efecto biocontrolador de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre el filopatógeno *Botrytis cinerea* causante de la "Mancha chocolate" en cultivos de haba de la comunidad de Chirapaca. Tesis de Maestría, IIFB, UMSA, La Paz – Bolivia.
- Commonwealth Mycological Institute (1974). *Descriptions of pathogenic fungi and bacteria* . 44: 431-440
- Coca, J., Hernández, O., Berrio, R., Martínez, S., Díaz, E., & Dustet, J., (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* Sección de Biotecnología Aplicada. Centro de Ingeniería de Procesos, Facultad de Ingeniería Química. Instituto Superior Politécnico José Antonio Echeverría. *Biotecnología Aplicada* 2001;18:216-220
- Crespo, W., (1996). Haba (*Vicia faba* L.) Leguminosas en la Agricultura Boliviana, Cochabamba – Bolivia. pp 178.
- Daughtrey, M. & Benson, M., (2005). Principles of plant health management for ornamental plant. *Annual Review of Phytopathology* 43: 141-169.
- Doss, R., Chastagner, G. & Riley K. (1984). Techniques for inoculum production and inoculation of lily leaves with *Botrytis elliptica*. *Plant Disease* 68:854-856.
- Doxtader, G., & Alexander, M., (1966) *Journal of Microbiology*. 12, p807
- Georgieva, D., Edreva, A., & Rodeva, R., (2003). Peroxidase response of ovaries and seeds in two host-parasite systems: *Triticum aestivum-Septoria nodorum* and *Lilium regale-Botrytis cinerea*. *Plant Peroxidase Newsletter*. Bulgarian Academy of Sciences. Institute of Genetics. 13:3-11.
- Ghisalberti, E.L., Narbey, M.J., Dewan, M.M., & Sivasithamparam, K., (1990). Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones. *Plant and Soil* 121, 287–291.
- Ghisalberti, E.L., & Sivasithamparam, K., 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology & Biochemistry* 23,1011–1020.
- Gong, Ch., Tsao, G., (1979). *Procesos de fermentación para celulasas*. UNAN Pp 111.
- Gonzalez, C., Rodriguez, A., Puertas, M., Fonseca, M., & Suarez, E., (2008). Actividad antagonica de cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de suelos de la provincia Granma. p. 162 En programa y Resumen III Seminario Internacional de Sanidad Vegetal. Cuba.
- GrootWassink G. & M. Gaucher, (1980) *Journal of Bacteriology*. Vol 3 141, 443.
- Gupta, K., Maggon, P., & Venkatasubramanian, A., (2003). *Environmental and Microbiology*. 32, 96

- Hanson, L.E., & Howell, C.R.,(2004). Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 94, 171–176.
- Harman, G.E., (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96, 190–194.
- Harman, G.E., & Kubicek, C.P., (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London, p. 278.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M., (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2, 43–56.
- Hsiang, T., & Chastagner, G., (1991). Growth and virulence of fungicideresistant isolates of three species of *Botrytis*. *Canadian journal of plant pathology* 13: 226-231.
- Hsieh, T., Haung, J., & Hsiang, T., (2001). Light and scanning electron microscopy studies on the infection of oriental lily leaves by *Botrytis elliptica*. *European journal of plant pathology* 6: 571-581.
- Instituto Boliviano De Tecnología Agropecuaria (IBTA) y Programa Nacional De Leguminosas De Grano (PNLG). 1996. Haba de exportación. Cochabamba, Bolivia. pp 6.
- Inbar, J., & Chet. I., (1997). The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Mycrobiology*. 141, 2823 – 2829.
- Jarvis. R., (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* species: taxonomy, physiology and pathogenicity. Ottawa Canada Department of Agriculture. 195p.
- Jarvis. R., (1992). Managing disease in greenhouse crops. Minnesota,APS Press.288p.
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K., & Lorito, M., (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology* 83, 11–23.
- Larrea V. (2005). Tecnologías para la producción de biopesticidas a base de entomopatógenos y su control de la calidad. INISAV – HABANA pp.25 – 31.
- LaTorre, B., (1986). Manejo de *Botrytis cinerea* en uva de mesa. *Revista frutícola*7(3):75-83.
- LaTorre. B., Rioja, M., (2002). Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Ciencia e investigación agraria* 2: 67-71.
- Luckner, L., Nover H. & Martwen K.,(1977), *Secondary Metabolism and Cell Differentiation*, p. 54.
- MACA, PNS (2005). Precios de semillas y semillas valor aproximado de la producción. 167 – 169.
- Maggon, P., & Gupta K., (1999), *Bacteriology*. 41, 822.

- Martin, F., & Aharonowitz V., (1982) Antibiotics Containing the Beta—Lactam Structure, *Journal of microbiology* 47. 125 – 145.
- Michel, A., Rebolledo, O., & Lezama, R., (2001) Cepas nativas de *Trichoderma* spp (*Euascomyces Hypocreales*), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum* (*Hypomicetes hyphales*). Tesis de Doctorado. TECNOCAM, UC, Colima – Mexico.
- Miller, W., (1992). *Easter and hibrid Lily productions*. Oregon, Timber press. 120p.
- Murille, J., & Imedo, C., (1976). *Genetic and Microbiology*. 148, 19.
- Mutlu, M., Sarioglu, K., Demir, N., Ercan, M.T. & Acar, J (1999) The use of comercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric, dertermination of enyme activity. *Journal of Food Engineering*. Vol. 41, 147 – 150.
- Naseby, D.C., Pascual, J.A., & Lynch, J.M., (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology* 88, 161–169.
- Pierola., O. (1997). Estrategia del cultivo de haba en Bolivia, *Memorias III Reunión Nacional en Leguminosas IV Reunión Bolivia de Rhizobiología*. La Paz, Bolivia. pp 33.
- Razak, CNA., Pillai SP., Yunus, WMZ., Ampon, K., Basri, M., & Salleh, AB., (1994). Production, purification and characterisation of lipase from a *Pseudomonas* species. *Malays Appl Biol*;22:115.24.
- Reissig, J; Straminger, J; & Leloir, F. (1957). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. *Journal of Biological chemistry*. Vol. 217, 959 – 966.
- Ries, S., (1995). *Gray mold of strawberry*. Vol. III *Fermentation Products* p 88.
- Sahilea, S., Fininsaa, C., Sakhujaa, P., & Ahmedb, S., (2007). Effect of mixed cropping and fungicides on chocolate spot (*Botrytis fabae*) of faba bean (*Vicia faba*) in Ethiopia *Crop Protection* 27 (2008) 275–282
- Salinas, J., Glandorf, D., Picavet, F., & Verhoeff, K., (1989). Effects of temperature, relative humidity and age of conidia on the incidence of spotting on gerbera flowers caused by *Botrytis cinerea*. *Plant Pathology* 10:133-141.
- Sanchez, L. Paniagua, R.C. Mateos, Lara. D., Mora. E., (1981) *Advances in Biotechnology*, Vol. III *Fermentation Products*, C. Vezina and K. Singh (eds.) p. 147.
- Segel, JH.(1982) *Calculos de bioquímica España*, Editorial Acribia.450 p.
- Sivasithamparam, K., & Ghisalberti, E.L., 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P., *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 139–191.

- Shih, O., & Marth, H., (2000) *Biochimistry* 338, p286.
- Taborsky V., (1992). Samll sacale prodessinf of microbial pesticides FAO Agrucultural Services Bulleletin 96; 35 – 45.
- Thomas, C., Marois, J., & English, T., (1988). The effects of wind speed, temperature, and relative humidity on development of aerial mycelium and conidia of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 78:260-265.
- Van Baarlen, P., Staats, M. & Van Kan, J., (2004). Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular plant pathology*. 5(6): 559-574.
- Verhoeff, K., (1974). Latent infections by fungus. *Phytopatology* 12:99-110.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S., & Lorito, M., Trichoderma interactions. Departamenti di Arboricoltura , Botanica e patologia vegetale, Universita degli Satudi di Napoli "Federico II", Partici Naples Italy.
- Waaijenbergh, H., (1996). Las leguminosas en la agricultura boliviana. Proyecto de Rhizobiología de Bolivia, Cochabamba, Bolivia. pp 1.
- Waaijenbergh, H., (2000). Programa Nacional de Leguminosas de Grano:Resultados de la investigación 1991 - 1998. Cochabamba, Bolivia. Pp 5 -7.
- Ward, K., & Packter, N., (1974) *Journal of Biochemistry* 46, p323.
- West, A., Barr, B., & Eylar, J., (1973). *Journal of Microbiology* 41, p 822.
- Woo, S.L., & Lorito, M., 2007. Exploiting the Interacciones between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. IOS, Springer Press, Amsterdam,the Netherlands, pp. 107–130.
- Yedidia, I., Shores, M., Kerem, Z., Benhamou, N., Kapulnik, Y., & Chet, I., 2003. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied Environmental Microbiology* 69, 7343–7353.

Anexos

ANEXO 1º

Composición del medio de cultivo agar – PDA.

Composición del medio	Cantidad
Papa	250.00 g/L
Agar	15.00 g/L
Glucosa	10.00 g/L
Agua destilada	1000 .00 mL

Para preparar este medio se procede de la siguiente manera;

- Pelar la papa, posteriormente cortarla en trozos pequeños y hervir en 1000 mL de agua destilada, una vez hervida esperar que enfríe y filtrar. añadir agar y glucosa; autoclavar a 120 atm por 15 minutos.

ANEXO 2

Composición del medio de cultivo caldo - CPD

Composición del medio	Cantidad
Papa	250.00 g/L
Glucosa	5.00 g/L
Agua destilada	1000 .00 mL

ANEXO 3

Composición del medio basal

Reactivo	Cantidad
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.05 %
HK ₂ PO ₄	0.06 %
H ₂ KPO ₄	0.05 %

ANEXO 4

Composición de los medios de cultivo específicos para la detección de la actividad enzimática.

A. Actividad Proteasa

(Agar gelatina)

Composición del medio	Cantidad
Gelatina	0.10 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Rojo fenol

(Agar leche)

Composición del medio	Cantidad
Leche en polvo	10.00 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Rojo fenol

(Agar carne)

Composición del medio	Cantidad
Extracto de carne	0.10 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Azul de Bromo timol

B. Actividad Lipasas

Composición del medio	Cantidad
Aceite vegetal	0.10 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Rojo fenol

C. Actividad Pectinasas

Composición del medio	Cantidad
Cascara de pomelo	5.00 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Azul de Bromo timol

D. Actividad Xilanasas

Composición del medio	Cantidad
Xilano	0.10 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Azul de Bromo timol

E. Actividad Celulasas

Composición del medio	Cantidad
Carboximetilcelulosa (CMC)	0.10 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Rojo Congo

F. Actividad Amilasas

Composición del medio	Cantidad
Almidón	0.10 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Iodo

G. Actividad Quitinasas

Composición del medio	Cantidad
Quitina	0.10 %
Agar	1.50 %
Medio Basal	100 mL
Indicador	Iodo

Una vez preparado el medio de cultivo se procedió a esterilizar los medios en autoclave a 1,5 atm y 120 °C, por 20 minutos, esperar que enfriar y distribuir el medio líquido uniformemente sobre las cajas petri, en campana de flujo laminar.

ANEXO 5

Composición química y preparación del reactivo DNS (ácido dinitrosalicílico).

Compuesto químico	Cantidad
Fenol	0.20 g
Sulfito de sodio	0.50 g
Ácido dinitrosalicílico	10.00 g
Hidróxido de sodio	10.00 g
Tartrato doble de sodio – potasio	200.00 g
Agua destilada csp	1000 mL

- ❖ Disolver el Hidróxido de sodio en 200 mL de agua.
- ❖ Añadir 100 mL de agua y disolver el sulfito de sodio.
- ❖ Añadir el fenol y enrasar a 500 mL disolver.
- ❖ Añadir el tartrato de sodio – potasio y adicionar una alícuota de agua.
- ❖ Adicionar el ácido dinitrosalicílico disolver completamente (aprox. 3 horas) y enrasar a 1000 mL.
- ❖ Todo el proceso anteriormente descrito debe llevarse a cabo en un matraz ámbar, empleando un agitador magnético, una vez concluida la preparación el mismo debe ser trasvasado a otro frasco ámbar para su conservación.

ANEXO 6

Composición del reactivo de Somogy I

Composición del medio	Cantidad
Tartrato de sodio y potasio	15.00 g/L
Carbonato de sodio	30.00 g/L
Sulfato de sodio	180.00 g/L
Agua destilada	1000.00 mL

ANEXO 7

Composición del reactivo de Somogy II

Composición del medio	Cantidad
Sulfato de cobre	16.00 g/L
Sulfato de sodio	144.00 g/L
Agua destilada	1000 .00 mL

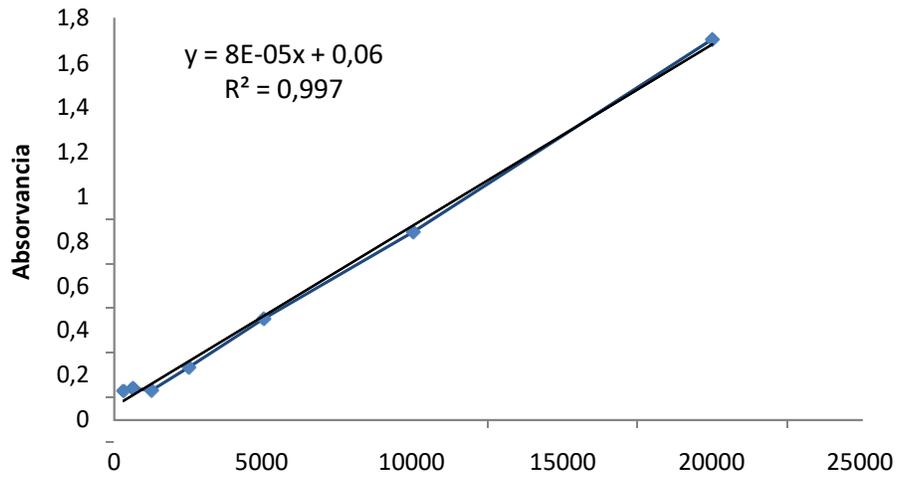
ANEXO 8

Composición del reactivo de Nelson

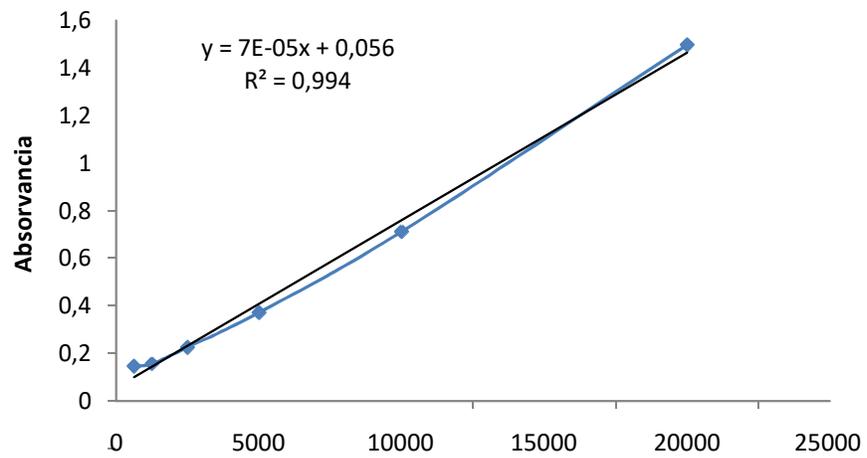
Composición del medio	Cantidad
Molibdenato de amonio	50.00 g/L
Acido sulfúrico	42.00 mL
Arseniato monoácido de sodio	50.00 g/L
Agua destilada	1000 .00 mL

ANEXO 9

Curva de calibración glucosa



Curva de calibración Xilosa 10



Fotografías



Fotografía N° 1 . Crecimiento del hongo biocontrolador *Trichoderma inhamatum* BOL 12 QD



Fotografía N° 2. Crecimiento del hongo patógeno *Botrytis fabae* BOL QJ 1



Fotografía N° 3. Producción de fermentos de *T. inhamatum* con diferentes filtros de luz.



Fotografía Nº 4. Producción de fermento de *T. inhamatum* en biorreactor de 20 L.



Fotografía Nº 5. Producción de fermento de *T. inhamatum*, con diferentes fuentes de carbono, Temperatura y pH.



Fotografía Nº 6. Producción de fermento de *T. inhamatum*, bajo parámetros físicos de agitación y aeración.



Fotografía Nº 7. Producción de fermento de *T. inhamatum*, con la adición de nitrato de amonio al medio de cultivo, analizando la influenciado de filtros de luz.



Fotografía Nº 8. Producción de fermento de *T. inhamatum*, mediante el co-cultivo de biomasa y esporas de *B. fabae*

Fotografía N° 9. Evaluación cualitativa de la actividad enzimática de *T. inhamatum* y *B. fabae*

Actividad amilolítica



Actividad celulolítica



Actividad pectinolítica



Actividad proteolítica



Actividad Quitinolítica



Actividad Xilanolítica



Actividad Lipolítica

