

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



TESIS DE GRADO

**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA DE ECOTIPOS DE HABA (*Vicia faba*) A
POBLACIONES DE *Botrytis fabae* Sard. DEL ALTIPLANO NORTE DE LA PAZ
EN CONDICIONES IN VITRO.**

NILDA MALDONADO FLORES

LA PAZ – BOLIVIA

2009

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA DE ECOTIPOS DE HABA (Vicia faba) A
POBLACIONES DE Botrytis fabae Sard. DEL ALTIPLANO NORTE DE LA PAZ
EN CONDICIONES IN VITRO.**

*Tesis de Grado presentado como requisito
parcial para optar el Título de
Ingeniero Agrónomo*

Nilda Maldonado Flores

Tutor:

Ing. M.Sc. Mario Coca Morante

Asesor:

Ph. D. David Cruz Choque

Tribunal Examinador

Ing. Agr. René Calatayud Valdez

Ph. D. Felix Marza

Ing. Agr. David Morales Velasquez

APROBADA

Presidente Tribunal Examinador:

DEDICATORIA

A mi madre Santusa Flores, por su gran ejemplo de perseverancia, amor y fortaleza.

A mi esposo Apolinar Tola y mis hijos Pablo y Danilo con quienes comparto este viaje hermoso de la vida.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento a Dios, por esta bendición, por creer en mi, por brindarme valor, determinación y apoyo en la culminación de esta meta.

Agradecimiento a la Universidad Mayor de San Andrés por medio de los señores Docentes y Auxiliares de Docencia de la Carrera de Ingeniería Agronómica, que me condujeron durante mi formación profesional. Un especial agradecimiento a aquellos que me enseñaron con el ejemplo y dieron de su tiempo.

Va mi agradecimiento al Ing. M.Sc. Mario Coca Morante por fungir como tutor en esta investigación.

Agradecimiento a la Oficina Regional de Semilla de La Paz quienes me permitieron el acceso a sus laboratorios en cuyas instalaciones se realizó este trabajo.

Agradecimiento a Ph. D. David Cruz Choque, de quien recibí orientación para la elaboración de este documento.

Un profundo agradecimiento a Ph. D. Felix Marza por toda su colaboración y cada uno de los miembros del Comité Revisor: Ing. Agr. René Calatayud Valdez, M. e Ing. Agr. David Morales Velásquez.

Agradecimiento especial a mi esposo y compañero Apolinar por su gran ayuda y apoyo, a mis hijos Pablo y Danilo. A mi madre que siempre estuvo a mi lado. A mis hermanos Rodolfo, Andrés y Germán gracias por creer en mi.

A los amigos que reconocí en momentos de incertidumbre: Freddy A. Mamani y Walter Zabaleta.

CONTENIDO GENERAL

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Contenido General	iii
Índice General	iii
Índice de Cuadros	vii
Índice de Figuras	viii
Índice de Fotos	ix
Resumen	x
1 INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Objetivos	2
1.1.1 Objetivo General	2
1.1.2 Objetivos específicos	2
1.1.3 Hipótesis (Ho)	2
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 El cultivo de haba (<i>Vicia faba</i>).	3
2.1.1 Producción	3
2.1.2 Clasificación sistemática del haba (<i>Vicia faba</i>).	3
2.1.3 Etapas fenológicas del haba (<i>Vicia faba</i>).	4
2.1.4 Variedades	6
2.2 Importancia del cultivo en Bolivia.	6
2.3 La importancia de las enfermedades y su control	8
2.3.1 Medidas de control basados en la inmunización	9
2.3.2 Variedades resistentes y tolerantes	9
2.4 Mejoramiento genético	10

2.5 Resistencia genética	11
2.5.1 Recursos genéticos	11
2.6 Trabajos realizados en Bolivia	11
2.6.1 Recolección y caracterización de germoplasma.	12
2.6.2 Identificación de fuentes de resistencia a enfermedades.	12
2.6.3 Trabajos en tolerancia.	13
2.7 Consideraciones generales acerca de <i>Botrytis</i>.	14
2.8 Mancha Chocolate (<i>Botrytis fabae</i>).	16
2.8.1 Estado actual de la enfermedad.	17
2.8.2 Importancia económica.	17
2.8.3 Descripción de la enfermedad.	17
2.8.4 Características del hongo.	19
2.8.5 Clasificación taxonómica del hongo	19
2.8.6 Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad	20
2.9 Métodos de propagación del hongo en laboratorio	21
2.10 Evaluación del crecimiento del hongo en medio de cultivo.	24
3 MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Localización	25
3.2 Materiales	25
3.2.1 Material biológico	25
3.2.2 Equipo de laboratorio	26
3.2.3 Vidrieria	26
3.2.4 Reactivos	26
3.2.5 Varios	26
3.3 Métodos	27
3.3.1 Recolección de material contaminado	27
3.3.2 Recolección de semilla	29

3.3.3	Siembra de semilla	29
3.3.4	Preparación de medios de cultivo	30
3.3.5	Reactivación del hongo	32
3.3.6	Identificación de <i>Botrytis fabae</i>	33
3.3.7	Inoculación y evaluaciones	33
3.3.7.1	Inoculaciones en medio de cultivo HDA	33
3.3.7.2	Preparación de suspensión conidial	36
3.3.7.3	Inoculación en foliolos	37
3.3.8	Diseño Experimental	39
3.3.8.1	Evaluación de velocidad de crecimiento micelial	39
3.3.8.2	Evaluación de resistencia	40
3.3.9	Variables de respuestas	42
3.3.9.1	Características morfológicas de poblaciones de <i>Botrytis fabae</i>	40
3.3.9.2	Evaluación de resistencia	41
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1	Recolección de material contaminado con <i>Botrytis</i>	42
4.2	Recolección de semilla	42
4.3	Reactivación del hongo	45
4.4	Identificación de <i>Botrytis fabae</i>	45
4.5	Inoculación	46
4.6	Variables de estudio	47
4.6.1	Evaluación de velocidad de crecimiento en medio de cultivo	47
4.6.2	Desarrollo micelial de colectas	50
4.6.3	Días a la esporulación	52
4.6.4	Aspecto de la colonia	53
4.6.5	Evaluación del avance del hongo en foliolo	55

5	CONCLUSIONES	57
6	RECOMENDACIONES	59
7	BIBLIOGRAFÍA	60

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Bancos de germoplasma de haba (<i>Vicia faba</i>)	11
CUADRO 2. Tiempos de esterilización para diferentes cantidades de medios de cultivo	22
CUADRO 3. Descripción de ecotipos	43
CUADRO 4. Peso de semillas	44
CUADRO 5. Relación de la existencia de <i>Botrytis</i> en extracción de muestras	46
CUADRO 6. Análisis de varianza para evaluación de velocidad de crecimiento	49
CUADRO 7. Prueba de comparación múltiple para poblaciones de <i>Botrytis fabae</i>	49
CUADRO 8. Análisis de varianza para evaluación de resistencia	55
CUADRO 9. Prueba de comparación múltiple para evaluación de resistencia	55

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Fases del ciclo de las relaciones patógeno – hospedero donde actúan los principios de Whetzel	15
FIGURA 2.	Desarrollo de las enfermedades producidas por el mohogris <i>Botrytis</i>	16
FIGURA 3.	Comportamiento de las cuatro poblaciones de <i>Botrytis fabae</i>	49
FIGURA 4.	Desarrollo del hongo a medios de cultivo HDA	50
FIGURA 5.	Características morfológicas del crecimiento micelial	51
FIGURA 6.	Aspecto de la colonia	54

INDICE DE FOTOS

FOTO 1.	Foliolos con síntomas de <i>Botrytis</i> , fase no agresiva	28
FOTO 2.	Frutos con síntomas de <i>Botrytis</i> , fase no agresiva	28
FOTO 3.	Plantas dispuestas en “callchas” comunidad Suntia Grande	28
FOTO 4.	“Callchas” de 30 días	28
FOTO 5.	Grano Gigante Copacabana, provincia Omasuyos	29
FOTO 6.	Productores de grano Cuenca rio Keka	29
FOTO 7.	Macetas con plántulas	30
FOTO 8.	Plantas con tamaño adecuado para extracción de foliolos	30
FOTO 9.	Detalle de crecimiento del hongo en medio de cultivo HDA	34
FOTO 10.	Cajas inoculadas con <i>Botrytis fabae</i> , llenas	36
FOTO 11.	Inoculación de foliolos en cámara de flujo laminar	37
FOTO 12.	Foliolos en cámara húmeda	37
FOTO 13.	Foliolos inoculados con <i>Botrytis fabae</i>	38
FOTO 14.	Foliolos en medio de cultivo A-A	38
FOTO 15.	Ecotipos de haba (<i>Vicia faba</i>)	44
FOTO 16.	Conidios y conidióforos de <i>Botrytis cinerea</i> , 1000X	45
FOTO 17.	Conidios y conidióforos de <i>Botrytis fabae</i> , 1000X	45
FOTO 18.	Contaminación en foliolos con medio A-A	47
FOTO 19.	Esclerocios de <i>Botrytis fabae</i> en medio HDA	49
FOTO 20.	Desarrollo de micelios	51
FOTO 21.	Aspecto de la colonia	54

RESUMEN

La presente investigación consistió en la evaluación de resistencia de ecotipos de haba (*Vicia faba*) a poblaciones de *Botrytis fabae* del Altiplano Norte de La Paz en condiciones in vitro, en laboratorio de la Oficina Regional de Semillas, ORS La Paz; Ubicada en la zona de Miraflores del departamento de La Paz. Con los objetivos de determinar el nivel de resistencia de ecotipos de haba y caracterizar morfológicamente poblaciones de *Botrytis fabae*.

Los materiales biológicos empleados fueron: tres ecotipos y una variedad de haba (Usnayo, Isla del Sol, Gigante Copacabana y Pairumani), poblaciones de *Botrytis fabae* provenientes de cuatro comunidades productoras de semilla (Chañi, Camacachi, Suntia grande y Chirapaca), pertenecientes a las provincias de Manco Kapac, Omasuyos y Los Andes del departamento de La Paz.

El trabajo se efectuó en tres etapas. La primera con la colecta de semillas y material contaminado de haba en las mismas comunidades de origen, al final del ciclo en su fase agresiva. La segunda consistió en la siembra de semillas en macetas. La tercera etapa en laboratorio, donde se efectuó la reactivación del hongo a partir de muestras infestadas. Se identificó *Botrytis fabae* para los aislamientos, inoculaciones en HDA y foliolos.

Realizados los análisis se verificó que el hongo *Botrytis fabae* procedente de la comunidad de Chañi manifiesta mayor agresividad, por un desarrollo acelerado y abundante formación de micelios, que derivan luego en la formación de esclerocios. Se logró la esporulación únicamente, del hongo proveniente de Camacachi (Tiquina), cuyas conidias se utilizó en el preparado de una suspensión de 5×10^5 conidias por ml. que se utilizó en la evaluación de resistencia en foliolos.

Existe diferencia altamente significativa entre Usnayo y Pairumani manifestada en 72 % de área afectada en foliolo tras la inoculación. La investigación sugiere que los tres primeros ecotipos manifiestan características de resistencia a la enfermedad de Mancha Chocolate, producida por *Botrytis fabae*.

1. INTRODUCCIÓN.

El grano de haba es considerado como alimento de alta calidad nutritiva (23 – 25 % proteína), constituyéndose así en una de las fuentes principales de alimentación de la población rural. La habilla existente en Bolivia es de tamaño gigante, en ocasiones mayor a 30 mm. en diámetro mayor, contrastando aún con variedades del lugar de origen en Mesopotamia. Algunos ecotipos regionales de haba (*Vicia faba* L.), han cobrado importancia en los últimos años, debido a la preferencia en mercados internacionales, por su gran tamaño.

Se considera a La mancha chocolate causada por *Botrytis fabae* y *cinerea* como una de las más importantes en cuanto a manchas foliares en haba (*Vicia faba* L), la cual según estudios realizados en provincia Los Andes La Paz, ocasiona pérdidas que oscilan de 30 a 80 % dependiendo de la etapa en que afecta al cultivo (De Quitón, 1994). Considerada por el mismo autor como enfermedad principal de zonas de altura.

Para el control de esta enfermedad, la medida más difundida es el uso de agentes químicos, esto resulta ser una opción costosa y no duradera. Estudios recientes muestran la dificultad del control por este medio, la cual puede ser debido a la presencia de una diversidad de razas de *Botrytis fabae*, esto corrobora el conocimiento de que la aparición de nuevas razas de un patógeno, quiebra la resistencia genética de variedades tradicionales.

Una opción ventajosa es la utilización de variedades o cultivares resistentes que presenta una serie de ventajas en relación a otros métodos de control de enfermedades. Se puede mencionar, la reducción en el empleo de productos fitosanitarios tóxicos y la protección al cultivo durante todo su ciclo de crecimiento y desarrollo. En evaluaciones del germoplasma de haba (*Vicia faba* L) recolectada en Bolivia, se efectuaron trabajos con haba de altura, resultado ser en su mayoría, moderadamente tolerantes a *Botrytis fabae*. En investigaciones más específicas con

genotipos sobresalientes de altura, se puede apreciar la importancia no solo del genotipo, sino también la localidad, aún dentro de una misma zona. Según criterio de (PNLG, 1996) el ecotipo Usnayo es susceptible a mancha chocolate (*Botrytis fabae*), pero (Medina 1998) lo considera el de menor susceptibilidad frente a otras haba de altura.

En la presente investigación se trabajó con tres ecotipos sobresalientes del Altiplano en cuanto a rendimiento y calidad de grano. Creemos que al trabajar con los mismos aportaremos a futuras investigaciones sobre la identificación de fuentes de resistencia genética a *Botrytis fabae*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

- Evaluar la resistencia de ecotipos de haba (*Vicia faba*) a poblaciones de *Botrytis fabae* Sard. del Altiplano norte de La Paz.

1.1.2 Objetivos específicos

- Conocer el nivel de resistencia de ecotipos de haba a poblaciones de *Botrytis fabae*, mediante la determinación de severidad en condiciones in vitro.
- Caracterizar morfológicamente poblaciones de *Botrytis fabae*, por medio de observaciones macroscópicas, microscópicas y evaluaciones de su desarrollo en laboratorio.

1.1.3 Hipótesis (Ho)

- El nivel de resistencia de ecotipos de haba (*Vicia faba*) en poblaciones de *Botrytis fabae*, no es diferente.
- No existe diferencias morfológicas en las poblaciones de *Botrytis fabae* de importantes zonas productoras de haba del Altiplano Norte de La Paz.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 El cultivo de haba (*Vicia faba*).

Son originarias como cultivo del Oriente Próximo, extendiéndose pronto por toda la cuenca mediterránea, casi desde el mismo comienzo de la agricultura. Los romanos fueron los que seleccionaron el tipo de haba de grano grande y aplanado que es el que actualmente se emplea para consumo en verde, extendiéndose a través de la Ruta de la Seda hasta China, e introducido en América, tras el descubrimiento del Nuevo Mundo (INFOAGRO, 2007).

2.1.1 Producción

Para el año 2002, la FAO brinda los siguientes datos estadísticos en el cultivo de haba. A nivel mundial, se presenta a Argelia como el país con mayor producción de haba verde 125.000 toneladas, continuando China con 115.991 toneladas. En América sobresale Perú con una producción de 66.085, México con 53.000 y Ecuador con 22.000 toneladas.

Las superficies cultivadas con haba muestran que Perú tiene las más extensas de América del Sur, (según **Anexo 6**), llegando en 1999 a 35 mil hectáreas, en relación a Bolivia en el mismo año alcanzó aproximadamente 28 mil hectáreas, con una producción total de haba fresca de **44.657 toneladas**, de las cuales 630.5 fueron exportadas a diferentes países del mundo (PROINPA/PADER 2001).

2.1.2 Clasificación sistemática del haba (*Vicia faba*).

Familia:	Fabaceae
Sub-familia:	Papilionoideae
Genero:	<i>Vicia</i>
Especie:	<i>Vicia faba</i>
Nombre común:	Haba

(Waaijenberg, 1996).

2.1.3 Etapas fenológicas del haba (*Vicia faba*).

La UPOV, utiliza los estados de desarrollo fenológico de acuerdo con las claves de identificación BBCH de *Vicia faba* L. (Meier, 1997):

Germinación, desarrollo de la hoja, formación de tallos laterales, elongación del tallo, emergencia de la inflorescencia, floración, desarrollo de los frutos, maduración y senescencia.

Waaijenbergh y Caro (2000), indican la diferencia de los cultivares de valle y las de altura; afirmando que las primeras son de porte pequeño con ciclo corto de cuatro a cinco meses, con un promedio en número de granos de dos a cinco por vaina. Caracterizando a las de altura como plantas grandes de ciclo largo (5 - 8 meses) y con uno a tres granos por vaina.

2.1.4 Variedades

Programa Nacional de Semillas, se encuentran inscritas como variedades en haba (*Vicia faba*), aquellas que han cumplido con el examen de la variedad donde se conoce la distinción, homogeneidad y estabilidad del material en cuestión.

El centro de Investigaciones fitoecogenéticas de Pairumani (CIFP) de la Fundación Simón I. Patiño de Cochabamba, ha obtenido a partir de material criollo procedente de diferentes zonas haberas del país, variedades tanto para valles como para alturas. Para el valle el CIFP dispone de las variedades: Pairumani 1, Pairumani 2, Pairumani 3 y Pairumani Precoz. Para las zonas de altura: Pairumani 4, Pairumani 5 y Pairumani 6. (Piérola y Siles, 2002).

Cabe mencionar los importantes logros que tuvo el Programa Nacional de Leguminosas (PNLG) durante su breve existencia (1991 – 1998), (Waaijenbergh, 1996) menciona que entre esos logros se destacan los materiales genéticos colectados y seleccionados, amplio conocimiento de la biología, valiosas

experiencias con el manejo agronómico de los cultivos, control de plagas y enfermedades. Entre los resultados tangibles del PNLG se destacan el logro de reunir en San Benito 220 entradas de haba y un número menor en otras leguminosas, los cuales continúan siendo evaluados y multiplicados.

(Heredia, 2005; comunicación personal) menciona que fueron materiales promisorios PLG 101 y PLG 201 que al ser interrumpido el Programa Nacional de Leguminosas desaparecieron. (Piérola, 1996; comunicación personal) informaba la existencia de germoplasma de haba, en el CIF-Pairumani y la falta de duplicados completos de los materiales del PNLG.

Existe un gran número de ecotipos, característicos de cada zona. Herbas (1995), menciona algunas que aún continúan siendo utilizadas: Waca Jawasa y criolla para las zonas altas de La Paz. En Potosí existe la utilización de los ecotipo: Habilla, Esquena y Criolla. En Chuquisaca: Media haba, Habilla y criolla. En Cochabamba: Habilla, Criolla, líneas PLG 101 y PLG 201 en alturas. En los valles: Camargo, Rosal, Francia, ecotipo Pandoja, y ecotipo Cajamarca. En Tarija los ecotipos de altura: Habilla, Banana y Criolla. Los de valle: Banana, Bosta de buey y Criolla.

Coca (2005), indica que los ecotipos más cultivados en la zona que rodea al lago Titicaca y Altiplano Norte con 3820 a 3870 msnm., son Gigante Copacabana y Usnayo, por su característica de poseer grano grande (diámetro mayor por encima de los 30 mm.) adecuados para la exportación a los mercados internacionales. Piérola (1997), hace notar el gran tamaño de estas habas, tanto las que proceden de la zona aledaña al lago Titicaca como de alguna de sus islas, que en este caso sería La Isla del Sol. Las condiciones en que se producen (aislada geográficamente), favorecen a mantener sus virtudes, razón por la cual se la considera excelente semilla.

Agricultores de la comunidad de Chañi informan que obtienen rendimientos de 3.0 t.ha⁻¹ con el ecotipo Gigante Copacabana. Con relación al tema, Coca (2004) opina

que una diversidad de factores de manejo, entre ellos culturales y biológicos, hace que el rendimiento potencial ($\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$) se vea afectado negativamente. Choque (2005), reporta un rendimiento de 3,643 tn/ha para el ecotipo Usnayo, según estudios realizados a orillas del Lago Titicaca en Cumana, provincia Los Andes. Piérola y Siles (2002) señalan que la variedad con mayor rendimiento es Pairumani 1, que en grano seco produce $5.715 \pm 0.33 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$. (Meneses *et al* 1996), indican que bajo condiciones comerciales los rendimientos con cultivares mejorados no sobrepasan de 2 y 3 $\text{t}\cdot\text{ha}^{-1}$. Para las zonas de valles y alturas respectivamente

2.2 Importancia del cultivo en Bolivia.

El cultivo de haba en Bolivia, es el mas importante entre las leguminosas; lo cual radica en diversos factores, que van desde su rol en los sistemas productivos agrícolas (rotación, abono verde, fijador de nitrógeno y otros), insumo alimenticio para ganado. Fuente proteica para la familia productora, generadora de ingresos por su venta y componente en las estrategias de seguridad alimentaria campesina frente a incidencias del medio ambiente y otras (PROINPA/PADER. 2001).

El potencial para la exportación a los mercados de Asia y Europa está en constante ascenso. Particular interés y mejor precio se obtienen con granos de tamaño grande, característica que se obtiene con materiales cultivados en las zonas altas de Bolivia. Para lugares económicamente deprimidos, como el norte de Potosí, el cultivo de haba es de gran importancia tanto desde el punto de vista económico como el nutricional para el agricultor. (Meneses *et al*, 1996).

Coca (2007), indica que existe un incremento en el flujo de comercialización de grano seco hacia la república del Perú, lo que favorece a las instituciones locales a organizarse para exportaciones de grano seco también hacia países de Europa y Japón. Asimismo indica que en Bolivia la producción de haba es realizada enteramente por pequeños agricultores. Se estima que la superficie cultivada anualmente a nivel nacional esta cerca de 30200 ha., dedicándose a su cultivo unas

200000 familias o unidades productivas. Para el año 2000 se observó un ligero incremento en la superficie cultivada y la producción pero los totales exportados decrecieron en aproximadamente 70 t. (INE, 2001).

Según (FAO 2000), Bolivia produce haba con un rendimiento de 1 t. ha⁻¹ el cual es bajo en comparación con otros países como Argentina con 9,17 t. ha⁻¹. Se puede decir de un rango aceptable cuando observamos el rendimiento de los mayores productores de haba en el mundo. Argelia con 0.40 t. ha⁻¹, China 2.11 t. ha⁻¹, Perú 1.17, Mexico 0.82 y Ecuador 0.86 tn. ha⁻¹ (**Anexo 7**).

La práctica tradicional del agricultor, en el manejo de la densidad de siembra, fertilidad del suelo, suministro de agua, control de plagas y enfermedades sumados a estrés bióticos, no necesariamente son los mas adecuados para el mejoramiento de la producción de haba. Por esta razón, el Programa Nacional de Leguminosas de Grano del Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria – IBTA, en el tiempo de su vigencia (1991 -1998), realizó una diversidad de estudios para mejorar los niveles de producción en las diferentes regiones del país (Informe Técnico PNLG, 1996).

Coca (2004), opina que la intensificación del cultivo ha ocasionado mayor incidencia de enfermedades foliares que afectan el rendimiento y calidad del producto. También la severidad está presente en diferentes grados aún dentro de una misma zona. Quitón (1994), señala que la mancha chocolate (*Botrytis fabae*) fue la enfermedad principal en las zonas de altura entre 3000 y 4000 m.s.n.m. causando pérdidas anuales de hasta la mitad del rendimiento y mermando la calidad de grano.

2.3 La importancia de las enfermedades y su control

Del Ponte y Luzzardi (2006), indican que la importancia de las enfermedades se manifiestan en el hecho de que afecta directa o indirectamente a toda la humanidad y que la importancia económica debe ser medida no solamente por el verdadero daño

que ocasionan, si no también por los costos de las medidas preventivas y por las limitaciones que imponen las especies cultivadas de plantas de determinadas zonas agrícolas.

Según la opinión de los mismos autores, en la actualidad para el control del avance de esos patógenos destructivos se utiliza fungicidas de forma general, sin embargo a pesar de la eficacia en el control de enfermedades éstos han sido aplicados en forma aislada, lo cual es incorrecto desde el punto de vista epidemiológico y ambiental.

Azevedo (2001), realiza algunas preguntas que hacen ver esta problemática: ¿Cuales son las razones para explicar el comportamiento errático de los fungicidas?, ¿Son las recomendaciones muy complicadas o hay falta de información?, ¿Cómo disminuir la probabilidad de errores en la utilización del producto en el campo? Existe consenso en la opinión de que los problemas de los agricultores no serán resueltos con tácticas aisladas o independientes.

El uso de variedades resistentes, forma parte del conjunto de métodos utilizados en el manejo integrado de enfermedades, donde de forma multidimensional, multidisciplinar y flexible se usa en combinación con la manipulación de hábitat, modificación de las prácticas culturales, control biológico, control físico, control químico, control legislativo, entre otros. Actuando en forma integrada pueden reducir la severidad de la enfermedad con alcance de la máxima productividad, sin perjuicios y agresiones al medio ambiente. Según los principios de Whetzel, enumerados como pasos lógicos y secuenciales en el control de enfermedades, considerando el ciclo de la enfermedad (Figura 1), se dará interés particular a las medidas de control basadas en la inmunización.

2.3.1 Medidas de control basados en la inmunización

El control basado en la inmunización básicamente es aquella en que hay la resistencia de la planta a los patógenos, sea por el uso de variedades resistentes o

tolerantes; uso de sustancias que induzcan la resistencia en la planta (inmunización química); uso del propio patógeno en concentraciones bajas (inmunización biológica) o resistencia inducida por la nutrición mineral de las plantas. Las plantas cultivadas son inmunes a la grande mayoría de los fitopatógenos existentes en la naturaleza; aunque cada cultivo de importancia agrícola es hospedero de un pequeño y diferente conjunto de patógenos que representan una parcela reducida del número total de patógenos conocidos (Del Ponte y Luzzardi, 2006).

2.3.2 Variedades resistentes y tolerantes

En la ausencia de barreras protectoras de control utilizadas por el hombre, o vencidas estas, el patógeno enfrenta, por parte de la planta hospedera, resistencia mayor o menor a su desarrollo, ya antes de la penetración, en la penetración, en las fases subsecuentes del proceso de la enfermedad, en la extensión de los tejidos afectados y en la producción del inóculo. Aunque esa resistencia sea baja, resta aún la posibilidad de los daños en el cultivo afectado ser poco pronunciado. Es en la explotación de esas características, naturalmente presentes en las poblaciones vegetales, que se fundamenta el principio de la inmunización genética resultando, entonces, en el uso de variedades inmunes, resistentes y tolerantes.

La verdadera resistencia al patógeno es genéticamente controlada por la presencia de unos pocos o muchos genes para resistencia. Hospederos y patógenos son incompatibles en mayor o en menor grado debido a la falta de reconocimiento químico entre los dos o porque la planta ejerce su autodefensa contra el patógeno, gracias a varios mecanismos ya existentes o activados en respuesta a la infección por el patógeno. Existen dos tipos de resistencia verdadera: La vertical y la horizontal (Del Ponte y Luzzardi, 2006).

Los mismos autores indican que en la resistencia vertical el patógeno presenta razas que atacan determinadas variedades de una especie hospedera. El uso de variedades con resistencia vertical es utilizado para el control de algunas

enfermedades importantes. Sin embargo, las variedades deben ser substituidas después de algún tiempo debido a la capacidad del patógeno en quebrar la resistencia de la planta con el surgimiento de razas que atacan aquella variedad. Mencionan también que la resistencia horizontal es controlada por muchos genes que controlan las diferentes etapas de los procesos fisiológicos de las plantas, involucradas en el mecanismo de defensa. Actúa en las fases de infección colonización y esporulación del ciclo de la enfermedad.

2.4 Mejoramiento genético

El uso de variedades resistentes es considerado el método de control ideal pues, siendo funcional, no aumenta directamente el costo de producción y puede hasta dispensar otras medidas de control. Sin embargo, muchas veces implica en sacrificio de la productividad y/o del valor comercial del producto. Este método es sin duda, uno de los más significativos avances tecnológicos de la agricultura. Existen cultivos donde el control de las enfermedades más importantes se da casi exclusivamente por medio de la resistencia, tales como las royas y carbones en cereales, manchas vasculares en hortalizas y las virosis en la mayoría de los cultivos.

Tres etapas básicas deben ser consideradas en cualquier programa de obtención y utilización de variedades resistentes:

- a)** Identificación de fuentes de resistencia, o sea identificar germoplasma que posea los genes en variedades requeridas.
- b)** Incorporar estos genes en variedades comerciales por medio de los métodos de mejoramiento.
- c)** Después de la obtención de de una variedad resistente, trazar la mejor estrategia para que la resistencia sea durable, considerando la naturaleza dinámica de las poblaciones patogénicas (Del Ponte y Luzzardi, 2006).

2.5 Resistencia genética

2.5.1 Recursos genéticos

La gran variabilidad genética está restringida solo a la especie *Vicia faba* L. debido a la imposibilidad de producir híbridos fértiles con las especies más cercanamente emparentadas.

Cuadro 1 Bancos de germoplasma de haba (*Vicia faba* L.)

Institución, ciudad	País	Entradas N°
ICARDA, Aleppo	Siria	3300
IBTA. San Benito, Cochabamba	Bolivia	400
CIFP, Pairumani, Cochabamba	Bolivia	350
Universidad Agraria La Molina, Lima	Perú	500
INIAA, Estación experimental Andes, Cusco	Perú	200
INIAP, Estación experimental Santa Catalina, Quito	Ecuador	150
ICA Centro Regional de Investigación, Obonuco, Pasto	Colombia	116

Fuente: Meneses et al. 1996.

A nivel mundial el tamaño de las colectas de haba es relativamente pequeño, comparado con aquellos en cereales, tubérculo u otras leguminosas de auto polinización (Meneses *et al.* 1996).

2.6 Trabajos realizados en Bolivia

Según (Crespo, 1996), uno de los factores que limita la producción de haba es la falta de cultivares resistentes a enfermedades, razón por la cual fue un tema para actividades de investigación y validación en el Programa Nacional de Leguminosas de Grano (PNLG). Señala que una de las consecuencias de la adopción de nuevos cultivares, sería la reducción de la variación genética y esto pondría en riesgo su

estabilidad. Indica también que se debería contar con recursos genéticos de diverso origen, para:

- Ampliar la base genética de los cultivares a formarse.
- Preservar los recursos genéticos de nuestra región.
- Incorporar resistencia a factores limitantes bióticos o abióticos.
- Conseguir mejores rendimientos en términos de cantidad y calidad.

Para estos cometidos se inició la recolección del germoplasma de haba en Bolivia.

2.6.1 Recolección y caracterización de germoplasma.

Según lo indicado por (Crespo 1996) en julio de 1991 se inició la recolección de ecotipos de haba en los departamentos de La Paz y Tarija, a la cual se continuó con los demás departamentos productores con excepción de Oruro. Se llegó a un total de 450 muestras, cuya tenencia y conservación se concentró en la estación experimental de San Benito. Con el objeto de conocer las accesiones colectadas se realizó la caracterización del germoplasma a partir de la primera gestión agrícola (1991 – 1992) y en cuatro campañas agrícolas se completó el trabajo. Existirían mayores coeficientes de variación, superior al 50%, en las variables agronómicas de peso de granos por planta, número de granos por vaina y el número de vainas por planta.

2.6.2 Identificación de fuentes de resistencia a enfermedades.

El Programa Nacional de Leguminosas inició esta actividad en 1993 – 1994, con énfasis en mancha chocolate, roya, alternaria y virosis, para ser utilizadas en el mejoramiento genético tradicional de las selecciones y/o hibridaciones. Se identificaron y seleccionaron 1972 plantas individuales en 15 poblaciones o ecotipos locales de Cochabamba, La Paz, Potosí y Tarija. Estas se evaluaron durante 1994 – 1995 en San Benito y Toralapa (Cochabamba), usando como parámetros la incidencia y severidad de las tres primeras enfermedades. Los informes sólo indicaron la susceptibilidad y / o resistencia de cada una de las poblaciones. Se

mencionó al cultivar PLG 101 como el más resistente a roya y mancha chocolate, pero susceptible a alternaria. No se encontró una población con resistencia a las tres enfermedades.

Los trabajos, aunque importantes, no tuvieron un aporte significativo, porque no dejó material sujeto de ser utilizado. El análisis de estabilidad para las localidades de zonas altas, indicó el buen comportamiento y la estabilidad de los cultivares Usnayo (procedente del Altiplano norte de La Paz) y Pairumani 5. Para la gestión 1997 - 1998, la mayor parte del personal antiguo del programa fue retirado, del trabajo del nuevo personal no se conocen informes técnicos. En el año 1998 – 1999 el programa solo funcionó en Cochabamba con recursos limitados (Crespo, 1996).

En trabajos realizados por (Medina, 1997) con material de La Paz y Potosí, donde se encuentran: Gigante Copacabana, Usnayo y habillas criollas, cerca a un 10% de plantas denotan comportamiento de resistencia bajo un amplio rango de condiciones medio ambientales y debido a que las plantas mostraron un rango de variación continua de extremadamente susceptible a muy resistente, se puede asumir que los materiales seleccionados tienen resistencia cuantitativa, especialmente para *Botrytis fabae*.

2.6.3 Trabajos en tolerancia.

(Crespo, 1996) indica que uno de los objetivos para el Mejoramiento de Haba, fue el de: Obtener cultivares de haba de valle y altura, tolerantes a las principales enfermedades, con características agronómicas deseables. Según Zegarra (1998), de 178 accesiones de la colección de germoplasma de haba de altura de San Benito, Cochabamba, el 50% es susceptible a mancha chocolate, de 30 – 50% moderadamente tolerantes y menor al 30% son tolerantes. La moda se encontraría con moderada tolerancia.

(Piérola y Siles, 2002) señalan que la variedad Pairumani 5 para zona alta o puna, es tolerante a la mancha chocolate (*Botrytis fabae*) y mancha concéntrica (*Alternaria sp.*). De esta variedad se habrían evaluado 50 familias en la localidad de Toralapa. La acumulación de familias con baja presencia y ausencia de severidad en el daño causado por la enfermedad, muestra la eficiencia de la selección aplicada en los ciclos anteriores a la población Pairumani 5.

2.7 Consideraciones generales acerca de *Botrytis*.

Las enfermedades causadas por *Botrytis*, quizá sean las enfermedades más comunes y más ampliamente distribuidas de hortalizas, plantas de ornato, frutales y aún de cultivos mayores en todo el mundo. El patógeno produce abundante micelio gris y varios conidióforos largos ramificados que presentan células apicales redondas que portan racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente los conidios cuando el clima es húmedo y luego estos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro (Agrios, 1996)

Dominguez (2004), señala que la enfermedad también es conocida con el nombre de *Sclerotinia sclerotiorum* a la forma de esclerocio, mientras a su forma conídica se la denomina *Botrytis vulgaris*, constituyéndose ambas formas en una sola especie, menciona también que es una enfermedad frecuente en cultivos de haba, judías y altramuces.

Las enfermedades cíclicas producen epidemias, que según Del Ponte y Luzzardi (2006), generan repetidos ciclos de desarrollo del patógeno con relación a su hospedero. El ciclo puede ser dividido en ciclo primario y ciclo secundario. El ciclo primario se caracteriza por la ocurrencia de una enfermedad iniciada por apareamiento de la primera lesión en una planta, causada por un propágulo del patógeno.

De este modo el primer paso del ciclo primario corresponde a la **sobrevivencia** del inóculo en un determinado lugar, denominado fuente de inóculo. Para que ocurra la infección, el inóculo producido en su fuente debe ser removido, transportado y depositado sobre el cultivo. Esta fase es llamada de **diseminación**. Después de la deposición del inóculo sobre la planta y habiendo condiciones ambientales favorables, ocurre la **infección**. Una vez establecida la enfermedad, el patógeno genera nuevos individuos que garantizará la perpetuación de la especie. Esta fase de multiplicación que ocurre antes de la diseminación, es la fase de **reproducción**. Las estructuras propagativas del patógeno producidas en la fase de reproducción serán diseminadas y alcanzarán otras plantas o partes de la misma planta, donde irá promover la infección y causar la enfermedad. En ese caso el ciclo se repetirá y todas las infecciones originadas de las lesiones y establecidas en la planta enferma, hacen parte del **ciclo secundario** (Del Ponte y Luzzardi, 2006).

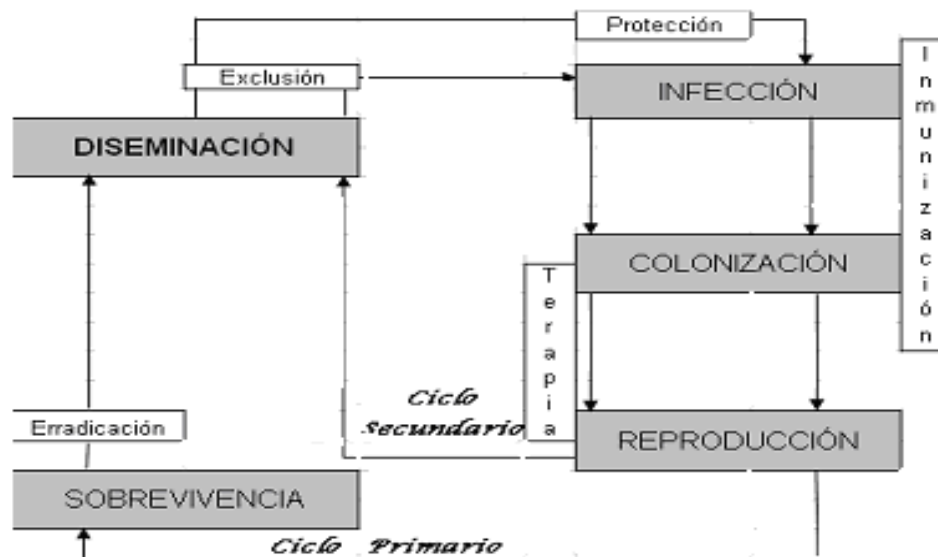


FIGURA 1. Fases del ciclo de las relaciones patógeno-hospedero donde actúan los principios de Whetzel. Adaptado de Kimati y Bergamim-Filho (1995)

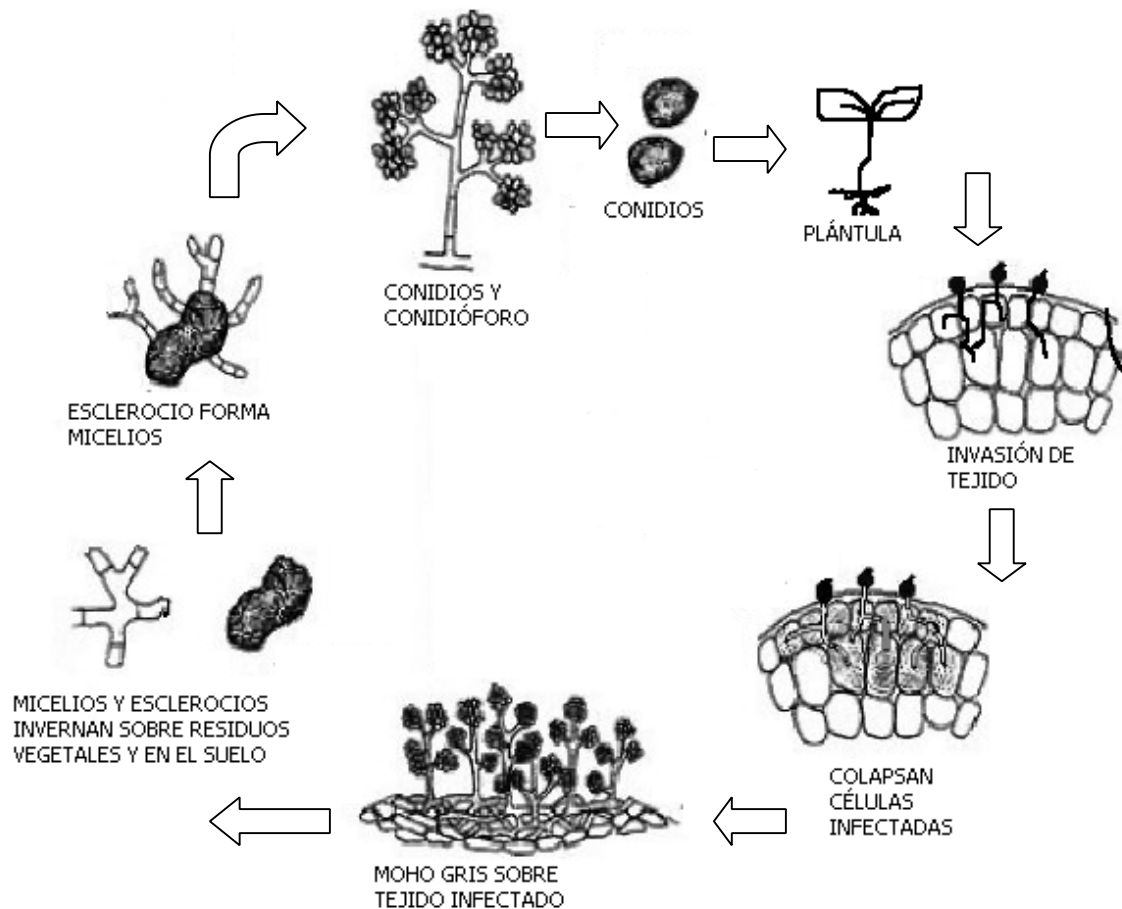


FIGURA 2. Desarrollo de las enfermedades producidas por el mohogris *Botrytis*

2.8 Mancha Chocolate (*Botrytis fabae*).

(Coca, 2004), señala que la enfermedad producida por este hongo tiene la característica de presentarse desde la emergencia hasta la fase de maduración del cultivo. En cuanto a efectos se registran en la producción de haba verde y calidad de grano seco (manchas sobre los granos). De igual manera indica que valores transformados de incidencia de tratamientos testigos, se aproximan a una línea recta, con un valor estimado de la tasa de infección aparente de $r = 0.1$, lo cual sugeriría un comportamiento aproximado a una epidemia policíclica del patógeno *Botrytis fabae* en condiciones del Altiplano Norte; este valor se consideraría bajo respecto a otras enfermedades policíclicas.

En condiciones del Altiplano el patógeno se mostraría virulento, el hospedante de ciclo tardío no es altamente susceptible y las condiciones medioambientales no son limitantes para el desarrollo de la enfermedad.

2.8.1 Estado actual de la enfermedad.

En las zonas tradicionalmente productoras de haba, en los últimos 12 años, se han evidenciado elevados porcentajes de incidencia de mancha chocolate y enfermedades viróticas. La mancha chocolate incide mayormente en la zona alta, sin embargo ambas enfermedades (mancha chocolate y viróticas) presentan epifitias conjuntas, evidenciando efectos detrimentales en los rendimientos y calidad del producto (Moreira et al, 1997)

2.8.2 Importancia económica.

Según (Coca, 2004), la enfermedad de Mancha chocolate, es una de las más conocidas y de mayor importancia económica en el Altiplano de La Paz y otras regiones productoras de haba en Bolivia.

(Quitón, 1994) indica que el haba como cultivo tradicional, tiene una gran limitante que es la enfermedad de *Botrytis fabae*. La misma que reduce la capacidad fotosintética y en consecuencia el rendimiento en 20 a 80 %.

2.8.3 Descripción de la enfermedad.

Etiología.- Es causada por el hongo Deuteromicete *Botrytis fabae* Sardiña, Se sabe que la especie *B. cinerea* Pers., también causa una enfermedad parecida a la mancha chocolate.

Patogénesis.- En la médula de los tallos muertos se encuentran unos corpúsculos negros duros; son los esclerocios que constituyen el estado de reposo del hongo,

quedan estos en el terreno, donde pueden persistir años sin perder la facultad germinativa. También aparecen los esclerocios entre las dos valvas de la legumbre (Domínguez, 2004). Este hongo produce macro y microconidios que son diseminados con el concurso del viento y el agua de riego y de la lluvia que salpica a toda la parte aérea de la planta (Herbas, 1981).

La *Botrytis* inverna en el suelo en forma de esclerocio o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Al parecer este hongo no infecta a las semillas, pero puede propagarse con las semillas contaminadas mediante esclerocios o sobre restos de plantas a los que ha infectado (Agrios, 1996)

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); 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 felpa color gris marrón sobre las mismas. La defoliación de las hojas y flores, ocurre como consecuencia de la infección. En las vainas verdes, la pudrición de vainas, ocurre desde la punta hacia la base, hasta necrosarla completamente. Los granos secos, presentan manchas irregulares de color marrón sobre el tegumento (Coca, 2004). Ninguna parte de la planta escapa a los ataques de *Botrytis*, las infecciones pequeñas causan una reducción del vigor de la planta, y también una producción más baja de la cosecha, en casos extremos la planta puede morir (Agroinformación, 2002).

Medios de lucha.- Según (Agroinformación, 2002) se debe sembrar en suelo bien drenado, espaciando las filas para ayudar a la circulación del aire. En recomendaciones de ORS La Paz (2005) se debería emplear 30-50 cm. Entre plantas y 60-80 cm. entre surcos para producción de semillas. Evitar los fertilizantes de alto contenido en nitrógeno, eliminar restos de cultivos anteriores y evitar el uso

de semillas provenientes de cultivares donde la enfermedad estuvo presente. De manifestarse la enfermedad, se debe arrancar inmediatamente las primeras plantas atacadas a golpe de azadón, retirando al mismo tiempo el cepellón de tierra que le rodea evitando así la presencia de algún esclerocio, las plantas se destruirán por fuego y de ningún modo se arrojarán al estercolero (Domínguez, 2004).

En el uso de pesticidas (Crepo, 1996) recomienda el uso de fungicidas a base de cobre como el oxiclورو de cobre. También fungicidas orgánicos como Maneb, Mancozeb y Benomil, los cuales en parcelas de investigación fueron efectivos. En informes presentados por (Quitón, 1994) de estudios realizados en el Altiplano norte de La Paz, señala que el fungicida Benlate, fue el mas efectivo para reducir la incidencia y severidad de la mancha chocolate, como también el de mayor costo.

2.8.4 Características del hongo.

Un examen microscópico cuidadoso, evidencia la presencia de *Botrytis fabae*, donde la manifestación de septas marcaría la diferencia con *Botrytis cinerea*. (Coca, 2004) indica que de acuerdo a aislamientos obtenidos, se mostraría una escasa presencia de septas en la parte terminal de los conidioforos en relación a lo descrito por Ellis (1971).

2.8.5 Clasificación taxonómica del hongo

Según Cruz (2001), el fitopatógeno pertenece a la subdivisión Deuteromycotina, familia Moniliaceae, género *Botrytis* y especie *Botrytis fabae*.

Subdivisión Deuteromycotina o Deuteromycetes (hongos imperfectos o asexuales)

En estos hongos se pueden observar las siguientes características: Carecen de estructuras o reproducción sexual al menos no se sabe que las presenten. Su micelio es generalmente tabicado y produce conidias ya en conidioforos, picnidios o

acérvulos. Debido a la semejanza de la fase asexual de los deuteromicetes con la de los Ascomycetes, se cree que muchas especies de la clase Ascomycete son la fase sexual de especies agrupadas dentro de la clase Deuteromycete (Cruz, 2001).

Clase Hyphomycetes

Las conidias se originan en conidióforos libres o directamente en hifas somáticas. Muchas de estas especies tienen su estado perfecto en la Subdivisión Ascomycotina.

2.8.6 Condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad

Las condiciones favorables para la infección son: temperaturas de 18 °C a 20 °C y una humedad relativa mayor al 80%. En zonas altas por encima de los 3000m, la mancha chocolate se presenta en verano entre los meses de diciembre a marzo, dependiendo del periodo de lluvias (Crespo, 1996).

La humedad es importante para el desarrollo de esta enfermedad. En años de alta humedad puede ser destructivo. La fase no agresiva, se presenta desde la emergencia hasta la madurez del cultivo. Durante el desarrollo del cultivo, la humedad dentro del follaje crea un microclima ideal para el desarrollo de la enfermedad, por lo que es importante la densidad del cultivo (entre surco y sobre surco). Abundante crecimiento vegetativo, alta humedad, lluvias y suelos pesados, hacen más vulnerables al cultivo para el desarrollo de la enfermedad (Coca, 2004).

Los micelios requieren 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. El patógeno muestra actividad a bajas temperaturas y produce pérdidas considerables en cosechas que se han mantenido almacenadas durante largos periodos, aun cuando las temperaturas estén entre 0 y 10° C. Las esporas que han germinado rara vez penetran directamente en los tejidos que muestran un crecimiento activo, pero penetran en los tejidos de la planta a través de heridas o

después de que se han desarrollado durante un cierto tiempo y han formado micelio sobre follaje moribundo (Domínguez y Tejero, 2004).

2.9 Métodos de propagación del hongo en laboratorio

Los trabajos referentes al aislamiento de los conidios para la realización de la caracterización de las cepas o bioensayos para determinar la virulencia de las mismas deben ser efectuados en un laboratorio que cuente con los implementos mínimos necesario y de esta forma obtener material biológico de buena calidad (Tovar 1999).

Temperatura

La temperatura del medio de cultivo debe mantenerse entre 27° y 28° C. siendo éste un parámetro de primera importancia, temperaturas menores afectan la cinética de crecimiento y la producción es muy baja, temperaturas más altas conducen a contaminaciones por bacterias del ambiente con pérdidas de material fúngico. (Morales 1992, citado por Tovar1999).

Medios de cultivo

Existen varios medios de cultivo: uno muy usado es el compuesto por la mezcla de 20 gramos de agar, 200 gramos de papa y 20 gramos de dextrosa, en un litro de agua destilada. Este medio es conocido comúnmente con el nombre de PDA (papa-dextrosa-agar) y para impedir el crecimiento de bacterias contaminantes se puede acidificar con ácido láctico. Otros medios de cultivo son Czapek, Agar Malta Agar, V-8 (jugo de vegetales) y HFDA (hojas de frijol, dextrosa y agar). Existen los comerciales, hidratados o sintéticos, que pueden usarse de acuerdo con requerimientos específicos. Usualmente los hongos crecen mejor en medios ricos en carbohidratos y con un pH entre 6 y 6.5 (Ospina, 1984).

Esterilización

El mismo autor menciona que el uso de autoclave es la forma más común para esterilizar el medio de cultivo vertido en tubos, cajas de Petri, matraces o frascos, así como para esterilizar otro tipo de materiales (por ejemplo, cristalería e instrumental). Recomendando una temperatura de 120 °C durante 15 a 20 min. a 1.5 atm de presión.

Cuadro 4. Tiempos de esterilización para diferentes cantidades de medio de Cultivo.

Volumen	Tiempo mínimo de esterilización a 1.5 atm. en (min)
20 - 50	15
75	20
250 -500	25
1000	30
1500	35
2000	40

Fuente: (Barba *et al.*, 2001)

Se debe tener ciertas precauciones en el empleo de las autoclaves por ejemplo, el medio no debe esterilizarse en grandes volúmenes empleando un solo recipiente, sino debe esterilizarse fraccionando en volúmenes pequeños en varios recipientes. A mayor cantidad de volumen del medio en un frasco, menor es el intercambio de calor. El instrumental y cristalería que se requiere esterilizar en autoclave debe envolverse con anterioridad en papel aluminio o papel secante. El etanol se utiliza al 70 – 80% (v/v) y se emplea principalmente para esterilizar cristalería e instrumental (bisturís, pinzas, agujas, etc.) por medio de flameo (Barba *et al.* 2001).

Preparación del inóculo

La cuantificación de la concentración de esporas permite determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso ó volumen existentes en una formulación, que sirven de base para establecer la dosificación de un producto.

Para el recuento de esporas se utiliza la cámara de Neubauer o Hemocitómetro, donde se debe:

- Lavar y secar el hemocitómetro.
- Agitar el tubo de la dilución de la muestra de la cual se va a hacer el conteo de esporas durante 30 segundos.
- Tomar inmediatamente la muestra de 0.01 ml, con micropipeta.
- Depositar con cuidado, de manera que el líquido entre por capilaridad sin formación de burbujas en la cámara, de lo contrario repetir el proceso.
- Dejar reposar medio minuto antes de proceder al conteo.
- Localizar con el objetivo 10x en el campo visual el cuadrante central de la cámara.
- Observar nítidamente los cuadrantes y pasar al objetivo 40x para el conteo (CENICAFÉ, 1996)

Inoculaciones

En los hongos el inóculo consiste generalmente de estructuras especializadas como los conidios, pero también las estructuras vegetativas como micelios, pueden servir de inóculo. (González, 1989) Durante la siembra *in vitro* debe existir un área estéril, por lo que en esta sala deben tenerse los máximos cuidados de asepsia. La forma más fácil de lograr esto es el empleo de una campana de flujo laminar de aire.

Si se cuenta con una lámpara auxiliar de luz ultravioleta, ésta puede encenderse de 10 a 15 min antes de iniciar la siembra *in vitro*. La luz ultravioleta actúa sobre los

ácidos nucleicos y proteínas de los microorganismos matándolos (el área debe ventilarse adecuadamente antes de utilizarla) (Barba *et al.* 2001).

Incubación

La aseveración de (Barba *et al.* 2001), es que esta área es indispensable para mantener el material en buenas condiciones. De manera general las temperaturas ideales para el desarrollo óptimo de los hongos varían entre 14 y 28°C, dependiendo del lugar de recolección de la muestra. Es recomendable determinar la temperatura óptima de desarrollo para cada hongo en cada zona.

2.10 Evaluación del crecimiento del hongo en medio de cultivo.

Según lo indicado por (Agrios, 1996), el crecimiento de un organismo es uniforme en un medio sólido, de esta manera se facilita la medición lineal, que puede realizarse periódicamente para establecer el ritmo de crecimiento. Las lecturas por tanto se pueden hacer midiendo el diámetro de desarrollo de las diferentes cepas sobre los medios sólidos. (Mamani, 2007) recomienda, mencionando a (French y Hebert, 1982), que para medir el desarrollo de micelios sobre el medio de cultivo se proceda de la siguiente manera:

- Dibujar sobre el envés de la placa una cruz, con tinta indeleble de esta manera identificar el centro donde fue inoculada la caja.
- Identificar cada placa con un número.
- Marcar los cuatro radios marcados en la placa.
- Las cifras de incremento permitirán preparar una curva de crecimiento.
- El ritmo promedio de crecimiento se calcula dividiendo el incremento total por el tiempo.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

La investigación fue realizada en el laboratorio de la Oficina Regional de Semillas (ORS) La Paz, dependiente del Programa Nacional de Semilla (PNS) Bolivia, ubicada en la zona de Miraflores, Provincia Murillo del Departamento de La Paz.

El origen de los materiales genéticos está en comunidades aledañas al Lago Titicaca, que debido al microclima existente, posee las condiciones óptimas para la producción de haba y son conocidas como zonas haberas (**Anexo 8**).

3.2 Materiales

3.2.1 Material biológico

Para este trabajo de investigación, se utilizaron tres ecotipos y una variedad de haba.

Gigante Copacabana, procedente de la comunidad de Chañi, provincia Manco Kapac, del Altiplano norte de La Paz, Ecotipo de ciclo largo aproximadamente 210 días a la maduración, semilla grande de testa clara, porte alto con numerosos macollos.

Usnayo, ecotipo procedente de la comunidad de Chirapaca, provincia Los Andes, del Altiplano norte de La Paz, de maduración tardía, grano de mediano a grande con testa clara. Considerado un material destacable por su estabilidad a través de los ensayos.

Isla del Sol, proveniente de la Isla con el mismo nombre en el Lago Titicaca, ciclo largo, semilla grande de testa delgada y clara.

Pairumani 1, proveniente de CIFP Cochabamba (Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani), variedad de ciclo semi precoz, planta de mediana

altura y grano pequeño a mediano con testa clara. Obtenida por el mismo Centro luego de varios ciclos de selección en diferentes ambientes a partir de material criollo procedentes de diferentes zonas haberas del país.

Se utilizaron, cuatro poblaciones de *Botrytis fabae*. Muestras provenientes de las comunidades:

- **Chañi**, provincia Manco Kapac, La Paz.
- **Camacachi**, provincia Manco Kapac, La Paz.
- **Suntia Grande**, provincia Omasuyo, La Paz
- **Chirapaca**, provincia Los Andes, La Paz.

3.2.2 Equipo de laboratorio

- | | |
|-------------------------------------|----------------------|
| - Cámara climatizada | - Mechero de alcohol |
| - Cámara de flujo laminar | - Pinzas |
| - Estereoscopio | - Balanza analítica |
| - Microscopio común | - Autoclave |
| - Termómetro de bulbo seco y húmedo | - Bisturíes |

3.2.3 Vidrieria

- | | |
|-----------------|--------------------------|
| - Hemocitómetro | - Vasos de precipitación |
| - Cajas Petri | - Porta y cubreobjetos |
| - Pipetas | - Frascos de vidrio |

3.2.4 Reactivos

- | | |
|-------------------|-------------------|
| - Agar | - Semilla de haba |
| - Agua destilada | - Lactofenol |
| - Alcohol etílico | - Ácido láctico |
| - Glucosa | |

3.2.5 Varios

- Parafilm

3.3 Métodos

3.3.1 Recolección de material contaminado.

Las comunidades elegidas para la recolección de *Botrytis* tienen época de siembra diferente, incidiendo principalmente el factor humedad. En la comunidad de Chirapaca (prov. Los Andes) y la comunidad Suntia Grande (provincia Omasuyos) producen con riego, razón por la cual pueden adelantar la siembra desde fines de Junio a principios de Julio. No sucede lo mismo con las comunidades de Chañi y Camacachi de la provincia Manco Kapac, donde siembran a mediados del mes de Septiembre, para aprovechar las lluvias de la época.

- En la recolección del material contaminado, se consideró la época de maduración de grano, cuando la enfermedad se torna agresiva y se observa mayor incidencia y severidad.
- En las comunidades de Chañi y Camacachi se efectuó la primera toma de muestras en la segunda quincena del mes de enero.
- Se eligió parcelas con la manifestación de la enfermedad (Mancha chocolate), seleccionando las plantas más afectadas.
- En la colecta de material contaminado con el hongo, en su mayoría se tomó foliolos, por la facilidad de su manejo.
- Se colocaron en bolsas plásticas con la identificación correspondiente
- En laboratorio se sometieron a un lavado con agua corriente.
- Posteriormente fueron puestas en ambiente estéril a 5 °C sobre toallas desechables para una lenta pérdida de humedad. Este procedimiento nos permitió tener disponible las muestras de las cuatro comunidades, al momento de ser utilizadas.
- En las comunidades de Chirapaca y Suntia Grande la colección de muestras fueron realizadas en la primera quincena del mes de Marzo.
- También se realizó la recolección de material durante el proceso de secado de semilla, cuando las plantas se encuentran dispuestas en “callchas”. En las

comunidades de Chañi y Tiquina en la segunda quincena de Marzo. En Suntia Grande y Chirapaca en la segunda quincena de Mayo.

- Fue muy importante la selección del material no expuesto directamente al sol, que baja notablemente la presencia del hongo.



Foto 1: Foliolos con síntomas de *Botrytis*, fase no agresiva



Foto 2: Frutos con síntomas de *Botrytis*, fase agresiva



Foto 3: Plantas dispuestas en “callchas”
Comunidad: Suntia Grande



Foto 4: “callchas” de 30 días

3.3.2 Recolección de semilla

Esta labor se llevó a cabo desde fines del mes de Marzo hasta fines del mes de Mayo. Durante estas semanas el agricultor está finalizando los trabajos de poscosecha. Las actividades que se realizaron durante esta fase implica las siguientes:

- La selección de parcelas y muestras al azar, tomando en cuenta, que el cultivo del grano sería destinado a semilla.
- La semilla de Pairumani 1, fue producida en la anterior cosecha y trasladada directamente del Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani (CIFP). El material llegado a laboratorio fue puesto en ambiente estéril a 5 °C.



Foto 5: Grano Gigante Copacabana
Provincia Omasuyo



Foto 6: Productores de grano
Cuenca del río Keka

3.3.3 Siembra de semilla

Para esta actividad las semillas pasaron por un proceso riguroso de selección, evitando aquellas con signo de enfermedades, afectadas por heladas, partidas y testa rota. Disminuyendo así la contaminación durante la germinación y emergencia. Sin embargo se realizaron otras acciones para dar mayor seguridad a esta labor:

- Se efectuó el tratamiento de termoterapia, sumergiendo las semillas en agua hervida por un lapso de tiempo de 3 minutos.

- Para la desinfección del suelo se procedió a la utilización de radiación solar, donde el suelo húmedo destinado a macetas fueron expuestas al sol en bolsas de nylon negro (para concentrar el calor) por espacio de dos semanas.
- Dada la dificultad de obtener folíolos en gran número, se recurrió a la siembra en pequeñas macetas, en número de diez macetas de cada ecotipo en lugar semiprotegido.
- Se sembró dos semillas por maceta.

Colocadas las macetas en lugar semiprotegido, se esperó cinco meses para la utilización de sus folíolos. Etapa en la cual se ve una mayor incidencia del hongo (*Botrytis fabae*) en campo.



Foto 7: Macetas con plántulas



Foto 8: Plantas con tamaño adecuadas para la extracción de folíolos

3.3.4 Preparación de medios de cultivo

- Haba, dextrosa y agar (HDA)**

En la preparación del medio de cultivo, se trabajó con el más adecuado, en virtud de la especificidad del hongo. Por tratarse de un fitopatógeno que ataca al haba, el medio se preparó en base a su grano. Las labores efectuadas fueron las siguientes:

- Pesado de 250 gramos de semilla de haba seca.
- Se procedió luego al cocido por 20 minutos a alta presión en 2 litros de agua.
- El líquido obtenido fue vertido en un recipiente transparente que permitió la utilización de la parte cristalina en la preparación del medio.
- Se empleó en la preparación tres cuartas parte de este líquido y una de agua destilada.
- Se eligieron frascos de 250 ml. de volumen, utilizando solo 200 ml con preparado para facilitar la manipulación al momento del plaqueado (llenado de cajas petri).
- La relación empleada fue: 20 gramos de agar y 20 gramos de azúcar por litro.
- El azúcar fue empleado en lugar de la dextrosa, que provee al cultivo de carbono y energía. Existe mejor crecimiento del hongo con medios ricos en carbohidratos.
- Los medio de cultivos en frascos de 250 ml y cajas petri vacías, fueron cubiertos cuidadosamente en papel sábana común.
- Acomodados luego en autoclave, evitando el contacto directo con las paredes de la misma.
- La esterilización fue hecha a 120 °C a una presión de 1.5 bares por 20 minutos.
- La Cámara de Flujo laminar permaneció encendida 15 minutos antes de recibir los medios de cultivo y cajas petri.
- Se empleó dos mecheros de alcohol a los costados para realizar el llenado de cajas con medio de cultivo (plaqueado).
- La temperatura del líquido fue la adecuada, no muy caliente para evitar la condensación del agua en las tapas que luego favorecen la contaminación del medio, ni muy frío para dificultar el vaciado al pasar de un estado líquido a semisólido.

b) Agar – Agua (A-A)

- Se eligieron frascos cuya capacidad era de 250 ml, a fin de facilitar el vaciado en las cajas petri.
- Se utilizó agua destilada para la preparación del medio.
- Las proporciones utilizadas fueron de 17 gramos de agar por cada litro de agua destilada, siendo estos dos los únicos componentes.
- Este medio fue utilizado, solo para dar sostén al foliolo.
- La esterilización se hizo en autoclave a 120 °C a una presión de 1.5 bares por 20 minutos.
- Para el vaciado en cajas petri se utilizó Cámara de Flujo Laminar empleando en cada caja aproximadamente 15 – 20 ml. de medio de cultivo.

3.3.5 Reactivación del hongo

El procedimiento contó con las siguientes actividades:

- Desinfección de recipientes plásticos más sus tapas con alcohol al 70 %.
- Colocado de papel toalla al fondo del envase y posterior humedecimiento con agua destilada esteril, evitando en lo posible el exceso.
- Sometimiento a flameo de portaobjetos y demás instrumental empleado, como ser: Bisturís, agujas y pinzas
- Los portaobjetos fueron colocados sobre el papel húmedo de los envases plásticos, guardando una debida distancia entre ellos.
- Colocado de muestras con evidentes síntomas de la enfermedad sobre los mismos. Con el cuidado necesario para que no exista contacto directo con la toalla húmeda.
- Estas actividades fueron realizadas con dos mecheros a los costados, a fin de disminuir las contaminaciones comunes en laboratorios. Trabajando dentro del área de asepsia que crea el mechero, aproximadamente 30 cm. de diámetro.
- Los envases fueron colocados en Cámara Húmeda a una temperatura de 25 °C por el lapso de tiempo de aproximadamente 72 horas.

3.3.6 Identificación de *Botrytis fabae*

En la realización de esta importante labor se efectuaron los siguientes pasos:

- Con la ayuda de estereoscopio, se pudo observar que en algunos lugares del material sometido a Cámara Húmeda existía la presencia de cuerpos fructíferos del hongo *Botrytis*.
- Para la identificación de muestras se procedió al aislamiento en portaobjetos, con empleo de lactofenol y cutex transparente sobre el cubreobjetos.
- Esta labor fue repetida en numerosas ocasiones, hasta adquirir la destreza necesaria para colocar en portaobjetos las conidias sin desprenderlas de los conidióforos.
- El tiempo en Cámara Húmeda debió ser adecuada (48 Hrs.), para evitar la formación de mayor cantidad de micelios que dificultaban la toma de muestra para el aislamiento.
- Las muestras de *Botrytis* fueron llevados al microscopio que facilitó la visualización del hongo e identificación. Se encontrótanto *Botrytis fabae*, como *Botrytis cinerea*.

3.3.7 Inoculación y evaluaciones

3.3.7.1 Inoculación en medio de cultivo HDA.

En la realización de esta actividad se procedió de la siguiente manera:

- Una vez identificado el hongo, se procedió a la selección de los mismos descartando el remanente de foliolos contaminados.
- Con la ayuda del estereoscopio se visualizaba los cuerpos fructíferos y con una aguja esterilizada se llevó las conidias al centro de la caja petri con HDA. Labor sumamente minuciosa, donde se tuvo el auxilio de dos mecheros de alcohol a los costados.
- Se tomó nota del orden en que fueron inoculadas las cajas para la respectiva enumeración.

- Inmediatamente después de la inoculación, fueron selladas con cinta de parafilm, lo que facilitó la manipulación y evitó la contaminación.
- La totalidad del trabajo se llevó a cabo sobre mesón esterilizado con alcohol al 70 %, sin el uso de Cámara de Flujo Laminar, por la dificultad de tener en ese lugar el estereoscopio, equipo vital para la ubicación de conidias.
- Las cajas inoculadas fueron llevadas a cámara climatizada a una temperatura de 25 °C.

Evaluación de velocidad de crecimiento micelial.

En esta tarea se tomo en cuenta el orden en que fueron realizadas las inoculaciones, procurando realizar las lecturas en ese mismo orden y a la misma hora.

- Con la ayuda de marcador indeleble fueron trazadas coordenadas (x, y) en la base de cada caja, tomando como centro de origen (o) el punto de inoculación.
- Habiendo llegado a las 48 horas, se procedió a realizar la primera lectura, midiendo los dos diámetros del círculo formado por el crecimiento de los micelios.
- A partir de la primera toma de datos las siguientes se efectuaron cada 24 horas.
- La evaluación de velocidad de crecimiento se lo hizo en milímetros con la ayuda de un calibrador, hasta el momento del llenado de la caja de 90 milímetros de diámetro.

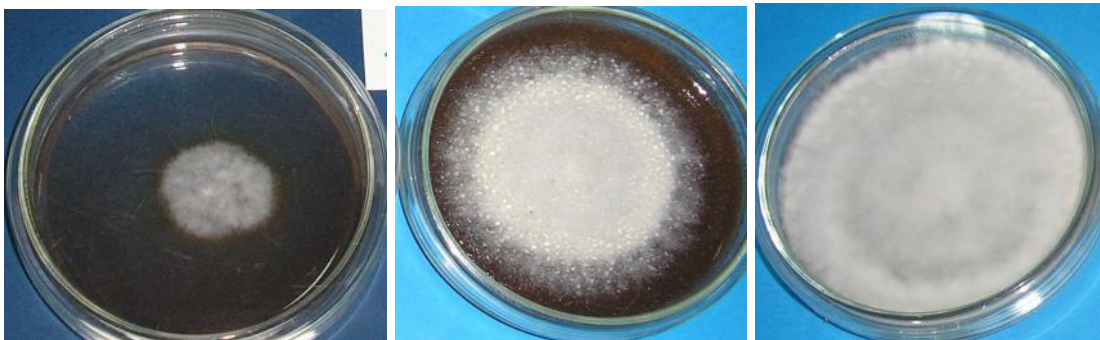


Foto 9: Detalle de crecimiento del hongo en medio de cultivo HDA

Desarrollo micelial de colectas.

La evaluación implicó los siguientes procedimientos:

- Transcurridos los cinco días se procedió a una observación macroscópica de la colonia, lo cual permitió determinar el desarrollo del mismo. Tornándose algunos con una expansión suave de micelios, otros con abundante crecimiento micelial y también un crecimiento vertical.
- Se efectuó las evaluaciones asignándolas a cuatro grupos.

Días a la esporulación

Para efectuar esta labor, se hicieron numerosas pruebas, a fin de obtener el esporulado en las poblaciones de *Botrytis fabae*.

- Las primeras cajas fueron puestas en cámara húmeda con cuatro inoculaciones, posteriormente con solo una al centro, de las cuales solo se obtuvo micelios.
- Se procedió a experimentar con la cantidad de medio de cultivo, donde la prueba primera fue puesta en cámara húmeda con aproximadamente 30 ml. de medio de cultivo, continuando con 20 y finalmente con 15 ml. El resultado fue el mismo.
- Las últimas pruebas fueron evaluadas con la presencia de conidias en la población procedente de la comunidad de Camacachi (Tiquina).

Aspecto de la colonia.

En la realización de esta actividad se procedió de la siguiente manera:

- Se efectuaron observaciones macroscópicas a partir del cuarto día, donde el aspecto micelial de las poblaciones se comienza a manifestar de forma particular. Esta actividad continuó hasta el llenado de cajas.
- Las notas fueron tomadas al sexto día de la inoculación clasificando las mismas de acuerdo a cinco grupos característicos en su mayoría. Esta labor se puede efectuar hasta el séptimo día, a partir del cual se dificulta por la particularidad de formas que adoptan cada una.

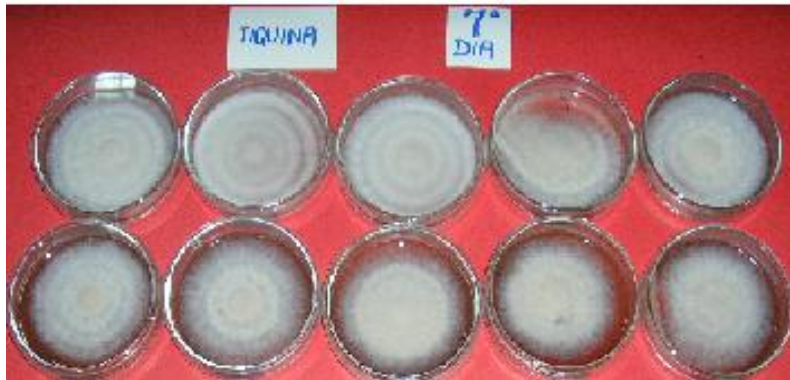


Foto 10: Cajas inoculadas con *Botrytis fabae* llenas.

3.3.7.2 Preparación de suspensión conidial

Se obtuvo la esporulación del material proveniente de la comunidad de Camacachi y a partir de él se procedió a la preparación de suspensión conidial de la siguiente manera:

- La caja petri donde se logró el esporulado del hongo, fue descubierta cuidadosamente en la presencia de dos mecheros, para evitar esporas de contaminantes.
- Se vertió en su interior agua destilada y esterilizada, en un volumen de 20 ml.
- Esta mezcla se trasladó a un tubo de ensayo.
- Para romper la tensión superficial del agua y lograr que los conidios formen parte de esta solución, se le agregó una pequeñísima parte de detergente.
- A fin de lograr una suspensión homogénea se procedió al agitado.
- Para lograr una buena infección, se tomó un parámetro intermedio en la concentración del inóculo, según sugerencias de (Ospina 1984), la cual llega a ser 5×10^5 esporas por ml.

Concentración de esporas

El conteo de esporas, permitió determinar el número de unidades infectivas por unidad de volumen existente en la formulación, sirvió de base para establecer la

dosificación del producto. Para el recuento de esporas se utilizó la cámara Neubauer o Hemocitómetro, realizando las siguientes acciones:

- Se procedió al lavado y secado cuidadoso del Hemocitómetro.
- Con una pipeta se tomó una muestra de la suspensión conidial ya preparada.
- Se depositó una gota en un extremo próximo al centro de la cámara Neubauer y se dejó que el líquido se extienda por capilaridad sin formar burbujas a la parte central. Dejamos reposar por medio minuto antes de proceder al conteo.
- Se llevó luego la cámara al microscopio, con el objetivo 10x se ubicó el cuadrante central. Cuando se veía de manera nítida, se pasó al objetivo 40x.
- Finalmente se procedió al conteo de esporas por cuadrante.
- Para la obtención de la concentración adecuada se recurrió a la siguiente fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, donde C= concentración y V= volumen.

3.3.7.3 Inoculación en foliolos



Foto 11: Inoculación de foliolos en Cámara de Flujo Laminar



Foto 12: Foliolos en cámara húmeda

- Cuando las plantas en macetas ya contaban con cinco meses se procedió a la extracción de foliolos, para llevarlas al laboratorio; teniendo el cuidado de elegir las que estuvieran sanas, que fueran de la parte media de la planta y de esta manera evitar trabajar con las más tiernas y con las maduras.
- En laboratorio se les hizo un lavado con agua corriente. Luego se procedió al trabajo en Cámara de Flujo Laminar, donde con la ayuda de pinzas flameadas,

- los foliolos se sumergieron en soluciones esterilizantes de superficie, pasando primero por alcohol al 70% y luego por agua destilada.
- Finalmente colocadas sobre toallas estériles para extraerles el exceso de agua.
 - Cada uno de los foliolos fue colocado en la parte central de las cajas petri con el medio de cultivo Agar-Agua.
 - Fueron inoculados con una gota de suspensión conidial de 5×10^5 . Se inoculó directamente sobre el tejido en el envés del foliolo, según lo sugerido por (Ospina 1984), luego fueron selladas con cinta parafilm, el mismo que facilitó la manipulación y evitó la contaminación.
 - Las cajas fueron puestas en cámara climatizada a 25 °C.

Evaluación del avance del hongo en foliolo

Para llevar a cabo esta actividad se siguieron los siguientes procedimientos:

- A partir de 72 horas de la inoculación fueron observadas en estereoscopio diariamente, a fin de detectar la aparición de los síntomas. Se tomó en cuenta el número de puntos cafés formados, los cuales crecieron en número, formando manchas tenues y luego manchas oscuras.

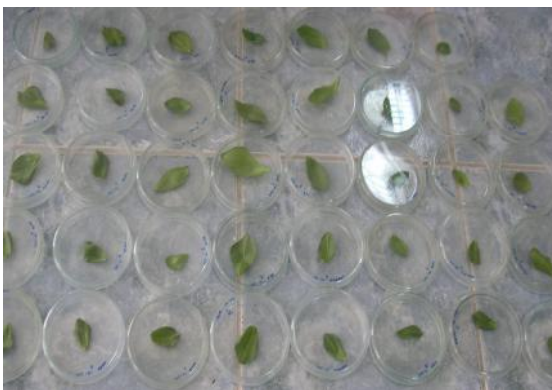


Foto 13: Foliolos inoculados con *Botrytis fabae*

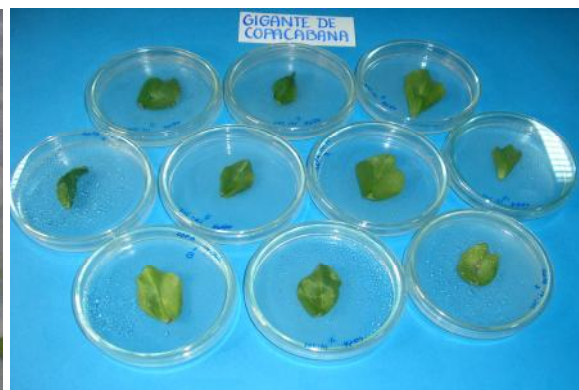


Foto 14: Foliolos en medio de cultivo A-A

- Pasado el periodo de los nueve días se disecaron los foliolos. Estos, fueron la base para obtener una imagen clara de los contornos del foliolo íntegro y de la mancha correspondiente.
- Este material fue escaneado y pasado directamente al programa PIXELES. La información allí obtenida permitió determinar las áreas afectadas y áreas libres de *Botrytis*,
- Para el análisis de datos correspondientes, se utilizó el porcentaje de área afectada por el hongo en relación al área total del foliolo, para determinar la severidad en cada ecotipo.

3.3.8 Diseño Experimental

3.3.8.1 Evaluación de Velocidad de crecimiento micelial.

El estudio fue instalado en base aun diseño **Completamente al Azar**, evaluando cuatro poblaciones de *Botrytis*, el modelo lineal aditivo fue:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \xi_{ij}$$

X_{ij} = observación cualquiera, debido a la i-esima población de *Botrytis fabae* y en la j-ésima repetición

μ = media general

α_i = efecto de la i -ésima población de *Botrytis*.

ξ_{ij} = error experimental

Se evaluó cuatro poblaciones de *Botrytis*, realizando tres repeticiones con 40 unidades experimentales.

Factores a evaluarse (tratamientos):

T1 = Chañi

T2 = Camacachi (Tiquina)

T3 = Suntia Grande

T4 = Chirapaca

3.3.8.2 Evaluación de resistencia

Este estudio fue realizado en base al **Diseño Completamente al Azar**, donde el modelo lineal aditivo fue el siguiente:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \xi_{ij}$$

X_{ij} = observación cualquiera, debido al i-ésimo ecotipo de haba en la j-ésima repetición.

μ = media general

α_i = efecto del i – ésimo ecotipo de haba.

ξ_{ij} = error experimental

Se evaluó tres ecotipos y una variedad de haba (*Vicia faba*). Efectuándose tres repeticiones con cuarenta unidades experimentales.

Factores a evaluarse (tratamientos):

T1 = Gigante Copacabana

T2 = Usnayo

T3 = Isla del Sol

T4 = Pairumani

Factor común, población de *Botrytis fabae*: Camacachi (Tiquina).

3.3.9 Variables de respuestas

3.3.9.1 Características morfológicas de poblaciones de *Botrytis fabae*.

Velocidad de crecimiento, medida tomada en área sobre tiempo. La inoculación realizada en el centro de la caja petri, fué tomada como el centro de origen de las coordenadas (x, y), a partir del cual se tenía dos diámetros de crecimiento en mm.

medidos cada 24 horas. El crecimiento del hongo en medio de cultivo, es generalmente circular, lo que permitió tomar datos de esa manera.

Desarrollo micelial de colectas, característica evaluada a partir de observaciones macroscópicas en el sexto día hasta el séptimo, tomando en cuenta el desarrollo micelial en las cajas inoculadas. La evolución se efectuó clasificándolas en cuatro grupos.

Días a la esporulación, característica evaluada a partir de observaciones diarias con estereoscopio en las cajas inoculadas.

Aspecto de la colonia, se logró en base a observaciones macroscópicas de la colonia, que permitió determinar la forma de crecimiento de los micelios y el aspecto general del mismo (algodonoso, plumoso, etc).

3.3.9.2 Evaluación de resistencia

Evaluación del avance del hongo en foliolo, Luego de 72 horas de la inoculación se procedió a realizar la primera observación, tomando nota de los puntos cafés que aparecieron sobre los foliolos, como síntomas de *Botrytis fabae*. Los puntos fueron formando manchas tenues, luego manchas oscuras, de lo cual también se tomo nota.

Determinación de severidad, Pasados los nueve días los foliolos fueron disecados. A partir de esto se pudo calcular el área de los foliolos, las manchas causadas por *Botrytis*, y determinar la severidad.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Recolección de material contaminado para identificación de *Botrytis*

Del material colectado con signos claros de enfermedad, se evidenció mayor presencia de *Botrytis* en muestras extraídas de la planta en etapa de maduración del grano, donde se extiende con pronunciada agresividad el hongo. Las muestras tomadas de diferentes partes de la planta (tallos, hoja y fruto) no dieron igual resultado en la manifestación del fitopatógeno, resultando ser la hoja el órgano en el que se identificó en mayor proporción el hongo; existiendo poca cantidad del mismo en frutos y casi ausente en tallos.

Esta situación puede deberse a que en algunos casos las hifas permanecen sobre la superficie externa de la hoja, parasitando solamente las células de la epidermis, para luego penetrar por las aberturas estomáticas. También puede ser debido a que los folíolos poseen mayor superficie de exposición a la llegada de conidios o micelios del hongo, que los demás órganos de la planta.

Del material colectado en poscosecha, hubo mayor presencia de *Botrytis* en los folíolos que no recibieron directamente los rayos solares, que se evidenció por conservar estas una coloración más oscura. Se podría suponer que el material contaminado habría sufrido la muerte del patógeno al haber recibido una mayor intensidad de radiación solar, creando condiciones desfavorables al patógeno. En virtud del cual se habría efectuado un control natural de enfermedad. El trabajar con folíolos disminuyó en gran medida la dificultad de obtener placas y aislamientos por no existir complicación en el manipuleo.

4.2 Recolección de semilla

Las comunidades de la Isla del Sol fueron durante mucho tiempo las que proveían de semilla a las comunidades que circundan el Lago Titicaca, tal era el caso de la

comunidad de Chañi, que ahora producen su propia semilla al haber recibido asesoramiento técnico para la producción de la misma. Las comunidades de Chañi, Camacachi y Chirapaca, son productoras de semilla certificada. La comunidad de Suntia Grande, perteneciente a la parte media de la Cuenca del Rio Keka, produce grano para exportación junto con otras comunidades pertenecientes a la parte alta de la cuenca.

En la colecta de semilla se logró reunir el material con sus características sobresalientes: Grano grande y testa clara. La falta de oxidación de la testa nos indicó que el material provenía de reciente cosecha.

Cuadro 3: Descripción de ecotipos

DATOS GENERALES				
Variedad botánica:	<i>Vicia faba</i> var. <i>major</i>	<i>Vicia faba</i> var. <i>major</i>	<i>Vicia faba</i> var. <i>major</i>	<i>Vicia faba</i> var. <i>equina</i>
Ecotipo	Gigante Copacab.	Usnayo	Isla del Sol	Pairumani
PROCEDENCIA				
Departamento	La Paz	La Paz	La Paz	Cochabamba
Provincia	Manco Kapac	Los Andes	Manco Kapac	Cercado
CARACTERÍSTICAS AGRONOMICAS				
Rendimiento en grano(t/ha)	2,76	3,643	2,08	5,715
Tamaño de grano	grande	grande	grande	mediano
Forma, sección logit. del grano	irregular	elíptica	irregular	elíptica
Color de testa (en grano seco)	clara (beige)	clara	clara	clara
CARACTERÍSTICAS FENOLÓGICAS				
Ciclo	tardío	tardío	tardío	semi precoz
Días a la maduración fisiológica	> 190 días	> 190 días	> 190 días	160 -190 días
% de germinación	95%	96%	91%	94%
Observaciones			> N° de semillas con testa rota	> N° de semillas con testa rota

El calibre del grano se puede apreciar, cuando se hace una pequeña comparación con una variedad mejorada en Chile (Portuguesa – INIA) a la cual consideran de buena calidad por el tamaño del grano, que llega a **14 granos por onza**. Con relación al presente estudio, los tres ecotipos evaluados poseen granos que sobrepasan en peso a la variedad mencionada. Esto es evidente al analizar los resultados obtenidos en el pesado de los mismos. Los tres ecotipos del Altiplano han logrado esta cualidad que las pone en ventaja con relación a otros ecotipos que no logran alcanzar este peso.

Cuadro 4: Peso de semillas

Ecotipo de haba	Peso de 100 semillas (gr)	Semillas por onza
Gigante Copacabana	305.74	9
Isla del Sol	300.24	9
Usnayo	217.94	12
Pairumani	155.7	17



Foto 15: Ecotipos de haba

4.3 Reactivación del hongo

En la reactivación del fitopatógeno a partir del material contaminado recolectado en campo, se encontró contaminantes comunes: *Aspergillus* y *Penicillium*. En principio la manifestación de *Botrytis* se hizo escasa, la dificultad fue en aumento debido a que se debía identificar el hongo *Botrytis fabae* para luego inocular los medios de cultivo en las cajas petri. Para subsanar el problema se procedió a la selección cuidadosa de los folíolos y el empleo de un número mucho mayor de cajas con sus respectivas muestras. Esta situación sugiere que los folíolos colectados también fueron atacados por otros hongos además de saprófitos y *Botrytis*.

4.4 Identificación de *Botrytis fabae*

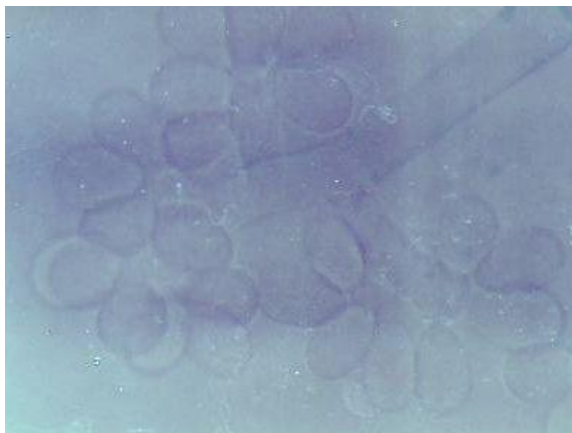


Foto 16: Conidios y conidióforo de *Botrytis cinerea*, 1000X

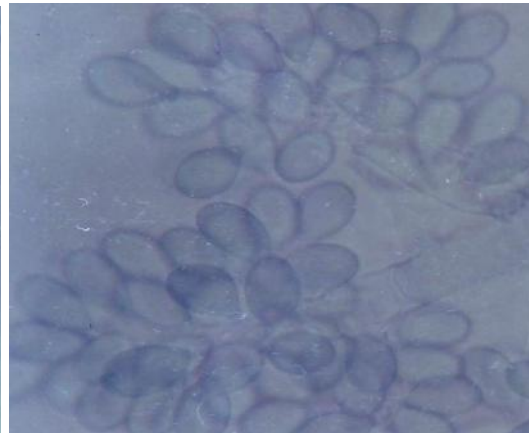


Foto 17 : Conidios y conidióforos de *Botrytis fabae*, 1000X

Durante el proceso de aislamiento del hongo para su identificación, se tomó en cuenta el tiempo que los folíolos contaminados permanecían en cámara húmeda. Al sobrepasar las 20 horas del esporulado, el aislamiento se tornaba imposible por la facilidad con que se desprendían las conidias de los conidióforos y la flacidez de los micelios.

A través de exámenes microscópicos, se logró diferenciar *Botrytis fabae* así como *Botrytis cinerea*, tomando en cuenta las aseveraciones de Ellis (1971) los cuales indican que la alta presencia de septas en la parte terminal de los conidióforos en el hongo *Botrytis fabae* es un carácter morfológico que la diferencia del fitopatógeno *B. cinerea*. El número de septas (dos) resultaría ser escaso para *Botrytis fabae* del Altiplano Norte de La Paz, según la opinión de Coca (2004). Con el número de aislamientos e identificaciones logradas se llegó a conocer la frecuencia con que estos dos hongos se presentan.

Cuadro 5. Relación de la existencia de *Botrytis* según identificación en muestras

Procedencia del hongo	<i>Botrytis fabae</i> (%)	<i>Botritis cinerea</i> (%)
Chañi	30	70
Tiquina (Camacachi)	37.0	62.0
Suntia Grande	33.0	66.0
Chirapaca	56.0	44.0

Heredia (1996), menciona a la mancha chocolate, causada por *Botrytis fabae* Sard. Como una de las enfermedades más conocidas y de mayor importancia económica en el altiplano de La Paz. Sin embargo al analizar la presencia notoria de *Botrytis cinerea* encontrada en las cuatro comunidades, muestra un indicio de que el ataque por parte de este hongo es bastante importante en el cultivo de haba, sumándose así al producido por *Botrytis fabae*.

4.5 Inoculación

Durante la realización de las primeras pruebas en inoculación de medios de cultivo HDA (haba-dextrosa-agar), existió la manifestación de hongos contaminantes especialmente *Penicillium* y *Aspergillus* de 20 a 80%, que ocasionaron la invalidez de esas pruebas. Para erradicar estos contaminantes se tomaron tres medidas:

- a). La utilización de rayos Ultra violeta durante quince minutos sobre instrumentos y materiales, antes de efectuarse el vaciado de cajas con medio de cultivo.
- b) El plaqueado fue realizado de manera exclusiva en cámara de flujo laminar, para luego nuevamente someter a treinta minutos de rayos ultra violeta, en esta ocasión las cajas llenas.
- c) Por último la utilización de dos mecheros al momento de la inoculación creando así una mayor área de asepsia, tomando en cuenta para la distribución de los mismos, que cada mechero libra de contaminantes un área aproximada de treinta centímetro de diámetro.

En lo referente a cajas con medio de Agar-Agua, luego de un procedimiento similar al anterior, se controló contaminantes con la utilización de alcohol al 70%, que resultó ser el de mayor efectividad en el tratamiento de foliolos.

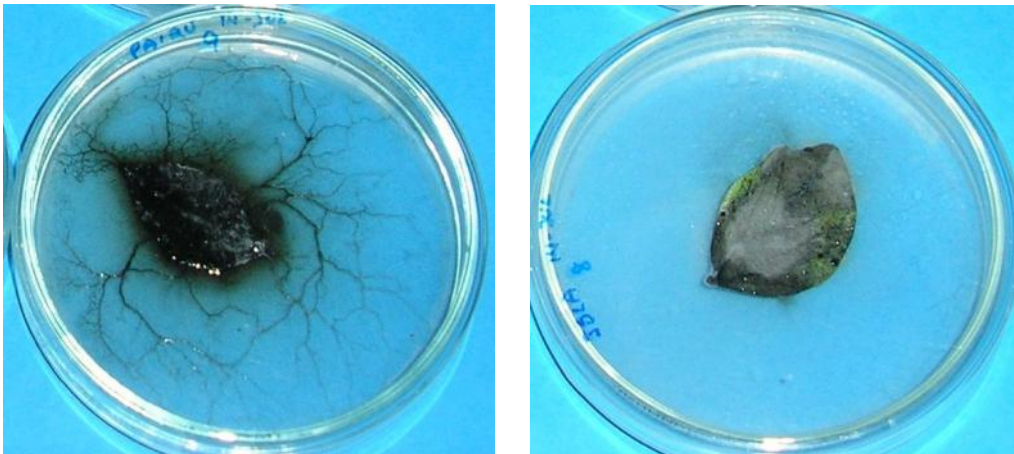


Foto 18: Contaminación en foliolos con medio A-A

4.6 Variables de estudio.

4.6.1 Evaluación de velocidad de crecimiento en medio de cultivo (HDA)

En el siguiente cuadro (datos **Anexo 1**) se empleó los promedios alcanzados del crecimiento micelial en cajas petri, al transcurrir 120 Hrs. de la inoculación. Se hicieron seis lecturas (7 días de la inoculación) tiempo suficiente para el llenado de la caja petri con micelios. Los resultados del estudio, correspondiente al análisis de

varianza de las poblaciones de *Botrytis fabae*, muestra la existencia de una diferencia altamente significativa entre los tratamientos, indicando la tendencia de un crecimiento micelial diferente entre poblaciones.

Cuadro 6. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EVALUACIÓN DE VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (MEDIAS).

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft 5%
Tratamientos	3	1454,34	484,78	58,61	2,86
Error	36	297,77	8,27		
Total	39				

CV= 4,74

Cuadro 7. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE PARA POBLACIONES DE <i>Botrytis fabae</i>	
TRATAMIENTO	MEDIA (Vel. de crecimiento)
T1: Chañi	70,4 a
T2: Suntia Grande	59.9 ab
T3: Chirapaca	58.0 ab
T4: Tiquina	54.1 b

TUKEY= 19,7

De acuerdo al análisis con prueba de significancia Tukey, el crecimiento micelial de *Botrytis* procedente del **T1** es estadísticamente superior al del **T4**. Así mismo las diferencias no son significativas entre los tratamientos **T1, T2 y T3**. El análisis de los tratamientos **T2, T3 y T4** muestra diferencias no significativas estadísticamente.

De este mismo comportamiento dependerá la ocupación rápida o lenta del fitopatógeno en los sitios de cultivo, asegurándose la sobrevivencia. Otra situación inherente al crecimiento de micelios es la formación de esclerocios los cuales se manifiestan de manera proporcional a la existencia de micelios, pues estos al compactarse dan lugar a estas estructuras. Nunes et al. (2005) con respecto a los mismos, menciona que en la ausencia de hospedero susceptible la persistencia de esclerocios en el suelo puede alcanzar hasta ocho años, también menciona que este

tipo de enfermedades pueden volverse más severa año tras año, por el acumulo de estructuras de resistencia. Esto indica que a mediano o largo plazo habría la posibilidad de que la enfermedad producida por este patógeno se extienda al no tomarse medidas necesarias.

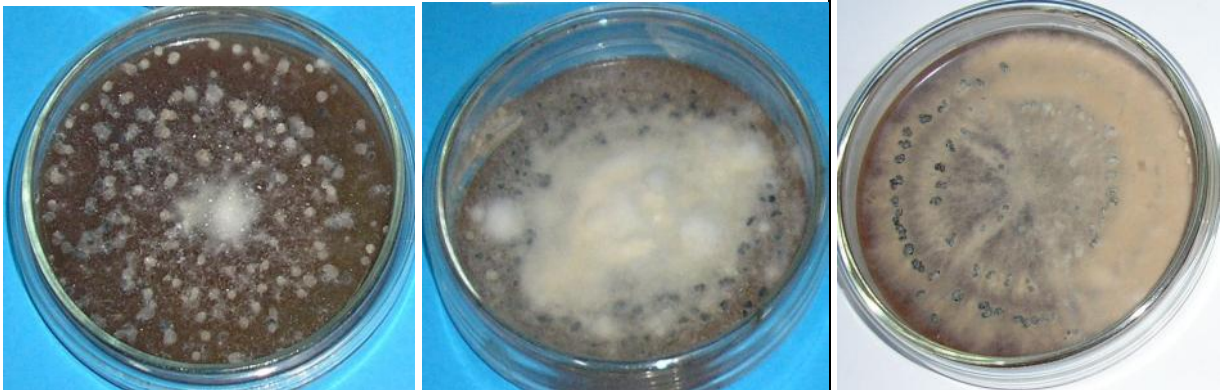


Foto 19: Esclerocios de *Botrytis fabae* en medio HDA

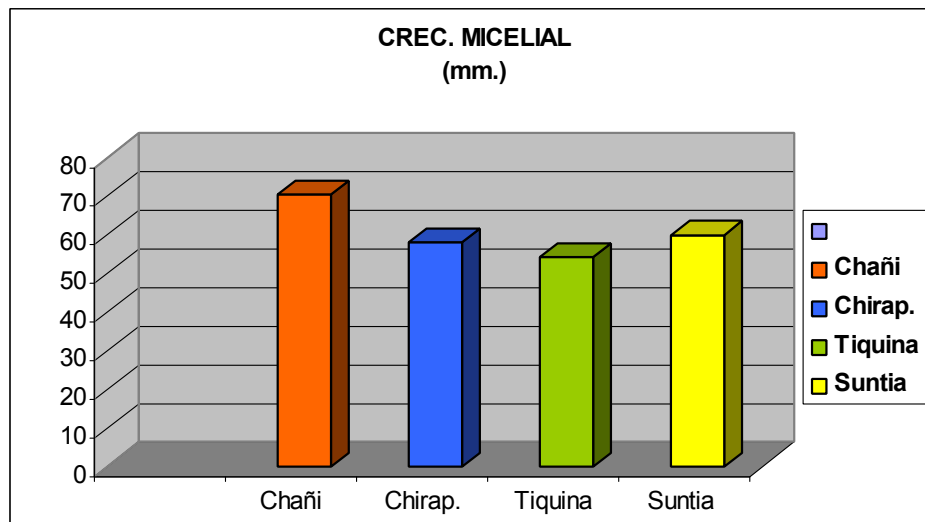


FIGURA 3. Comportamiento de las cuatro poblaciones de *Botrytis fabae* (120 hrs. de la inoculación)

Transcurrido 120 hrs. de la inoculación con *Botrytis fabae* en medio de cultivo HDA (haba-dextrosa agar), el hongo proveniente de la comunidad de Chañi (Figura 4), mostró índices mayores en la velocidad de crecimiento de micelios. Estos resultados permiten inferir que este hongo muestra cierta agresividad en el estado de

incubación, durante el desarrollo del inóculo. El hongo proveniente de la comunidad de Camacachi (Tiquina), se encuentra en el otro extremo, sugiriendo poseer una menor agresividad. Las diferencias en el desarrollo probablemente se deban también a una variabilidad genética.

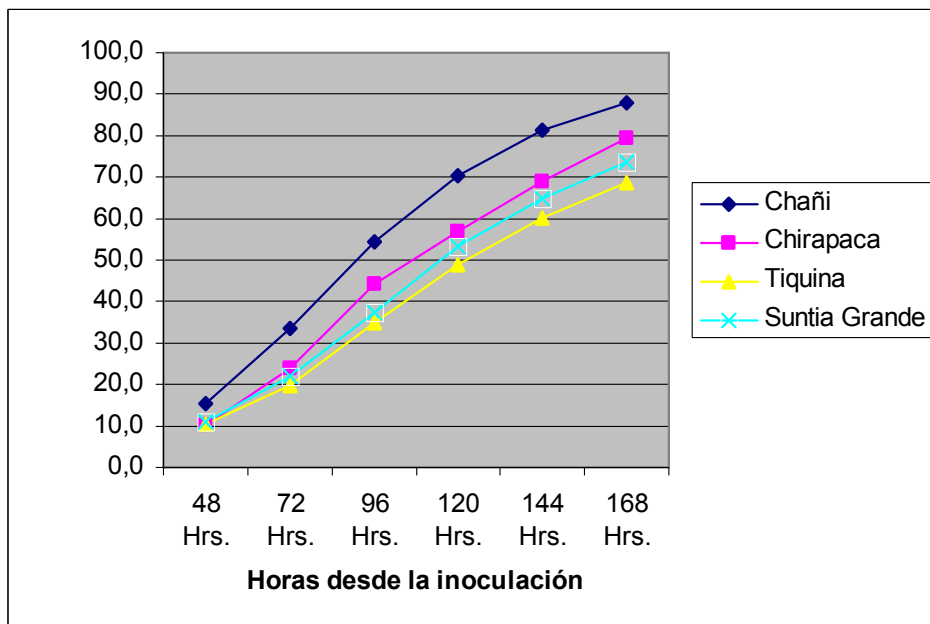


FIGURA 4. Desarrollo del hongo en medio de cultivo HDA.

4.6.2 Desarrollo micelial de colectas.

En observaciones macroscópicas de cajas inoculadas con poblaciones de *Botrytis fabae*, se manifestaron diferentes tipos del desarrollo de micelios, los cuales se clasificaron en cuatro grupos. Esta característica pudo ser evaluada desde el quinto al séptimo día de inoculación, que es el tiempo aproximado que tarda en llenar la caja, pasado este periodo tuvieron un desarrollo tan variada que resultó imposible la agrupación.

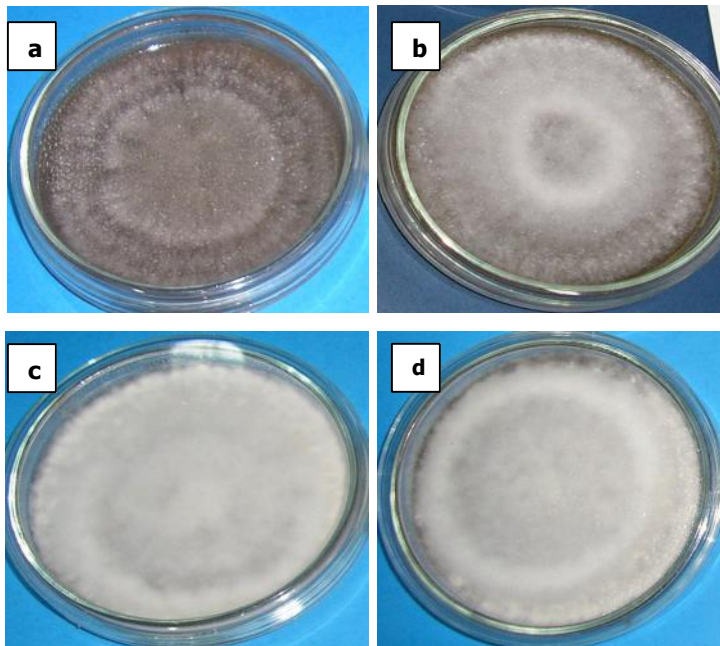


Foto 20: Desarrollo de micelios

- a. Poco micelio, b. Presencia media de micelios
- c. Abundante micelio, d. Crecimiento en espesor de micelio

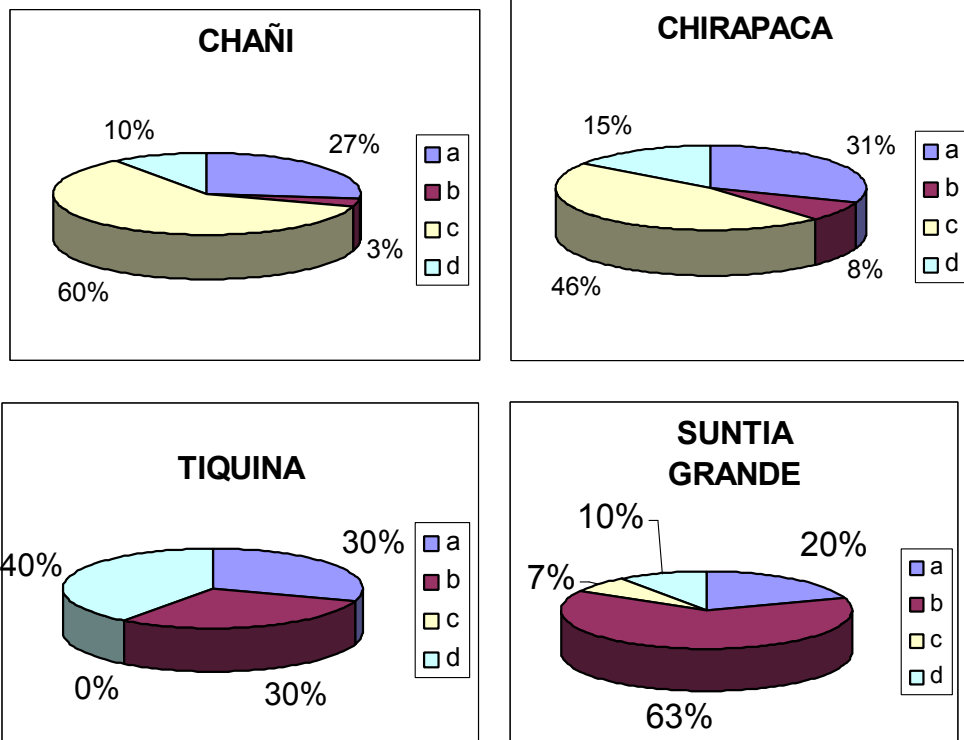


FIGURA 5. Característica morfológica del crecimiento micelial

La **figura 5** representa la manifestación del crecimiento micelial de los hongos, que sugiere una emisión abundante de micelios en las poblaciones de Chañi y Chirapaca. Es importante recalcar que la formación de esclerocios es en forma proporcional a la emisión de micelios, lo que hace estimar que el fitopatógeno proveniente de ambas comunidades formará mayor cantidad de estructuras de sobrevivencia, poniendo en riesgo los cultivos donde llegue el inóculo.

4.6.3 Días a la esporulación

Con la finalidad de evaluar características de las poblaciones de *Botrytis fabae*, se efectuaron las pruebas correspondientes a fin de determinar los días a la esporulación, medidos desde la inoculación. En numerosas pruebas realizadas solo se logró la esporulación del material proveniente de la comunidad de Camacachi (Tiquina), el cual llegó a esporular al sexto día en el 70% de las cajas inoculadas. Las cajas cuyo contenido provenían de las otras comunidades, solo manifestaron crecimiento micelial, para luego formar esclerocios.

El comportamiento de las colectas puede deberse a las diferentes condiciones ambientales del lugar de recolección de las muestras. Factores con los cuales no se pudo experimentar en laboratorio por las limitaciones existentes. Según datos de SENAMMI, 2005; la comunidad de Chirapaca habría contado con una temperatura media anual de 9,1 °C; una máxima media anual de 16,15°C, con su extrema de 17,8. La temperatura mínima anual habría llegado a 2°C con una extrema de -1.1 °C. Llegando a un promedio de la Humedad Relativa anual de 56,4 %. La comunidad de Camacachi (Tiquina) habría tenido una temperatura anual de 9°C, con una máxima media anual de 17°C, una extrema máxima de 21°C, una mínima anual de 1.7 °C con la extrema mínima de -2°C. La H°R estaría fluctuando alrededor del 60%.

Estas condiciones podría ser una de las razones por las que no se obtuvo el esporulado de las poblaciones de *Botrytis fabae*, ya que los datos correspondientes

indicarían una diferencia en las temperaturas extremas y la humedad. Es así que la Comunidad de Camacachi (Tiquina), situada a orillas del Lago Titicaca se caracterizaría por ser una zona de mayor humedad con temperaturas de mínima y máxima de amplio rango. Otra de las causas podría ser el factor de iluminación, pues los hongos presentan mecanismos para reaccionar ante variaciones en la calidad y la intensidad de la luz, pues algunos hongos esporulan ante la presencia de luz azul cercana a la ultravioleta, pero pueden preferir diversas frecuencias del espectro, como lo indican Mayea y Padrón (1983).

4.6.4 Aspecto de la colonia

Nuevas observaciones macroscópicas permitieron determinar la característica del aspecto de la colonia. Estas formas singulares se pudieron evidenciar cuando el crecimiento micelial llenó las cajas, al séptimo día aproximadamente. A partir de ese momento, las formas adquieren tal número de formas que resulta imposible evaluarlas. La **Figura 6**, indica que la población de *Botrytis fabae* proveniente de la comunidad Chañi manifiesta un crecimiento del tipo parejo (A) en un 60% y la ausencia total del crecimiento del tipo (B). Con respecto a la población proveniente de la comunidad de Chirapaca el desarrollo micelial adquiere la forma del tipo ondas (B) en un 13,44% y existe una mínima manifestación 3.10% en el crecimiento de la forma pareja (A). La población de Camacachi (Tiquina) manifiesta un crecimiento micelial del tipo (E) en un 16.54%, ausencia total de la forma (C) y de la forma (D) un 1.3%. Con respecto a la población proveniente de la comunidad de Suntia Grande el cuadro indica una mayor manifestación del crecimiento del tipo (B) con 12,40%, como mínima la forma (C) con 3.10% y no existe manifestación del crecimiento del tipo (D). Es común en las cuatro comunidades los tipos de crecimiento (A), (B) y (E), pero no en la misma proporción. Las formas (C) y (D) son las menos frecuentes. Una de las razones para esta manifestación podría ser la variabilidad genética existente en las poblaciones de *Botrytis Fabae*, pues en réplicas a partir de micelios manifestaban similares características.

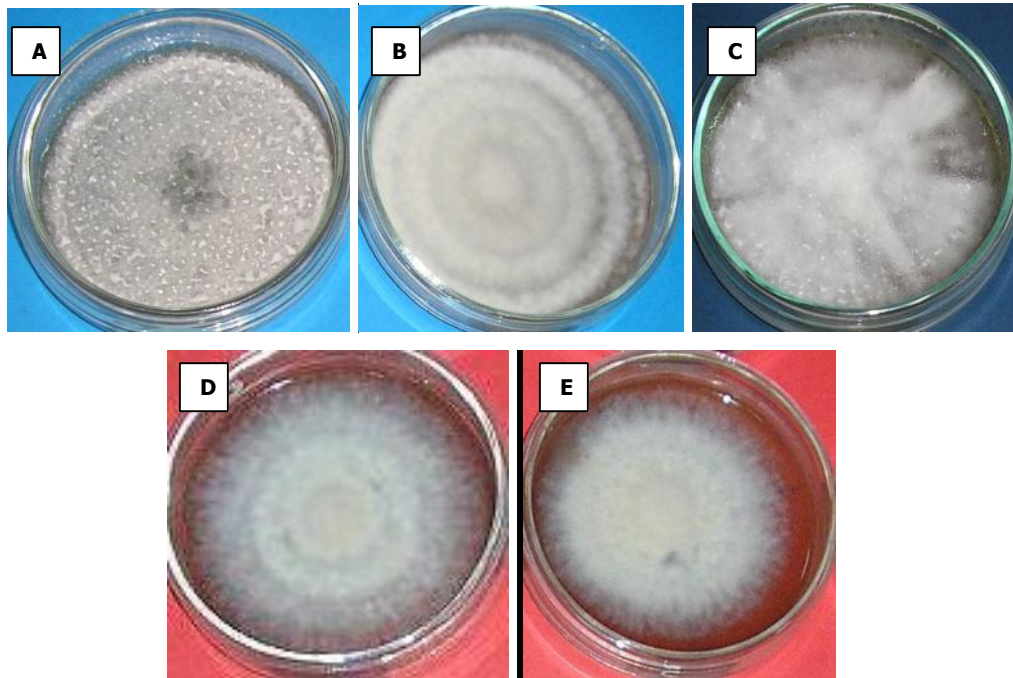


Foto 21: Aspecto de la colonia

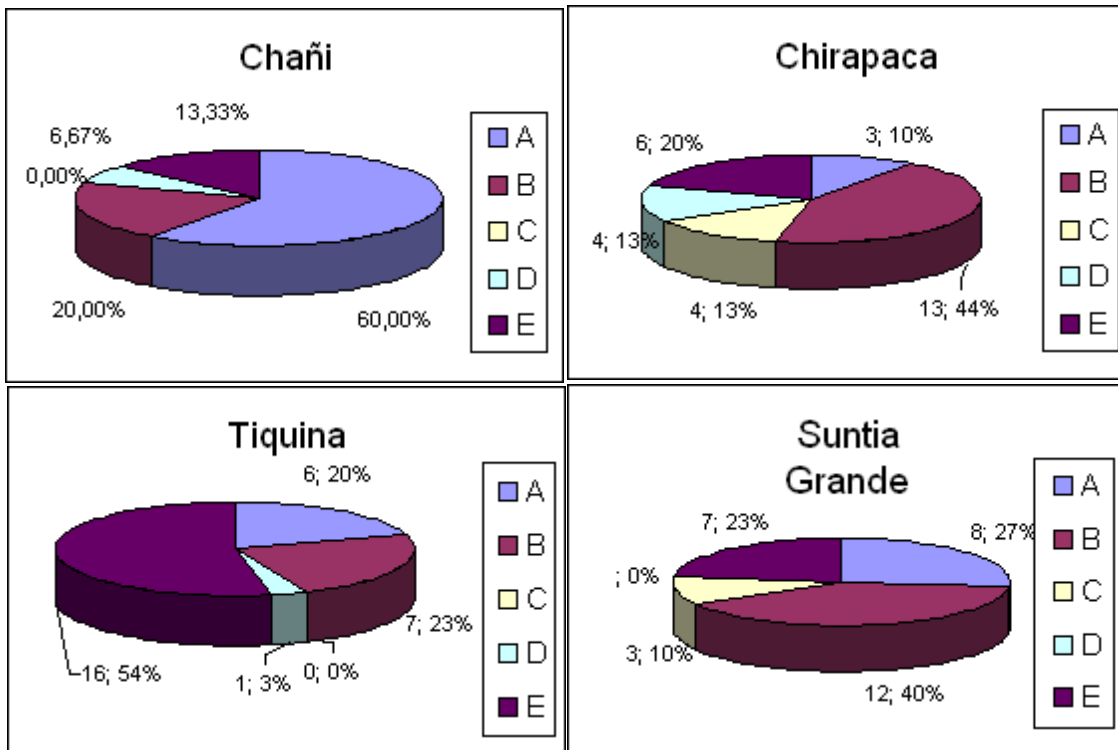


FIGURA 6. Aspecto de la colonia

4.6.5 Evaluación del avance del hongo en foliolo

En la evaluación de resistencia de ecotipos al hongo *Botrytis fabae*, se utilizó únicamente la población proveniente de Camacachi (Tiquina), que en condiciones de laboratorio logró esporular. A partir de las conidias obtenidas se procedió a la preparación de diluciones, para proceder con las inoculaciones de foliolos. La suspensión conidial empleada fue de 5×10^5 esporas por ml.

El análisis de varianza del siguiente cuadro (datos **Anexo 3**) muestra una diferencia altamente significativa entre los tratamientos, que indica la diferente reacción de los ecotipos de haba (*Vicia faba*) al ataque del hongo *Botrytis fabae*.

Cuadro 8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA
Área del foliolo expresado en % (MEDIAS)

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft(5%)
Tratamientos	3	38413,9	12804,6	452,142	2.86
Error	36	1019,52	28,3199		
Total	39				

MEDIA 20,21

CV= 26,33

Cuadro 9. PRUEBA DE COMPARACIÓN MÚLTIPLE PARA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A <i>Botrytis fabae</i>	
TRATAMIENTO	MEDIA (Área afectada expr. en %)
Pairumani	73,88 a
Isla del Sol	3,03 b
Gigante Copacabana	2,25 bc
Usnayo	1,68 bc

TUKEY= 19,7

Según el análisis con prueba de comparación Tukey, (datos **Anexo 4**), existirían tres grupos en cuanto a resistencia de ecotipos al ataque de *Botrytis fabae*. En términos estadísticos la variedad Pairumani mostraría una diferencia significativa con los tres ecotipos del Altiplano Norte (Isla del Sol, Gigante Copacabana y Usnayo). La prueba indica la diferencia del ecotipo Isla del Sol con Gigante Copacabana y Usnayo.

Existiría similitud entre los ecotipos Gigante Copacabana y Usnayo donde sus diferencias estadísticamente no son significativas. La diferencia entre el de mayor susceptibilidad (Variedad Pairumani) y el que muestra menos susceptibilidad (ecotipo Usnayo) llegaría a ser de 72.2 % en área foliar afectada.

Los resultados obtenidos de las inoculación con *Botrytis fabae* a ecotipos de haba (*Vicia faba*) corroboran los resultados obtenidos por Medina (1997) en estudios realizados con habillas procedentes de La Paz y Potosí, donde figura Usnayo como la de menor susceptibilidad. De Quiton (2000) opina de manera diferente, quien menciona al ecotipo Usnayo como susceptible a la enfermedad mancha chocolate.

No se tienen antecedentes con respecto a la resistencia a enfermedades del ecotipo Isla del Sol, sin embargo los resultados del presente estudio evidencian una resistencia menor a *Botrytis fabae* en relación a los ecotipos Usnayo y Gigante Copacabana, pero mayor con respecto al de Pairumani. Se podría estimar la existencia de una mayor resistencia en los ecotipos de haba con ciclo largo, cuyo cultivo se efectúa en el Altiplano, en relación a los poseen un ciclo mediano o precoz.

El estudio hace estimar la superioridad de los ecotipos del Altiplano Norte en cuanto a cierta resistencia a la enfermedad Mancha Chocolate producida por el hongo *Botrytis fabae*, sobresaliendo los ecotipos Usnayo y Gigante Copacabana. Los cuales bien podrían considerarse como una fuente de resistencia y a partir de los cuales trabajar en la obtención de variedades.

5. CONCLUSIONES

Se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El crecimiento micelial de la población de *Botrytis fabae* procedente de Chañi se muestra con mayor agresividad, teniendo un crecimiento medio de 70,4 mm. con $\pm 3,5$ mm. de la media a 120 hrs. de la inoculación. Tomando en cuenta que la cantidad de esclerocios que producen va en proporción directa a la cantidad de micelios, se puede entender que logra producir mayor cantidad de medios de propagación.
Este aspecto es preocupante, debido a que esa comunidad es una de las mayores productoras de semilla en haba las cuales llegan a diferentes zonas haberas. Existe el peligro latente de la diseminando del hongo *Botrytis fabae*.
2. La presencia abundante de micelio en *Botrytis* procedente de Chañi corrobora los resultados de la velocidad de crecimiento, donde es evidente que el crecimiento de los mismos no solo es en superficie, sino también en mayor cantidad.
3. El aspecto que adoptan las colonias son muy variados y solamente pueden evaluarse con claridad hasta el séptimo día, si bien esta característica no es determinante, sin embargo podría ser un punto de referencia importante para evaluar la variabilidad genética.
4. La falta de esporulado en las poblaciones de *Botrytis* provenientes de Chañi, Suntia Grande y Chirapaca, nos indica que cada una requiere de diferentes condiciones en calidad, horas luz, humedad y temperatura, factores con los cuales no se pudo trabajar por las limitaciones físicas del laboratorio.

5. La determinación del avance del hongo en foliolos de haba, mostró diferencias altamente significativas de los ecotipos procedentes del Altiplano Norte de La Paz con la variedad Pairumani de Cochabamba, especialmente con el ecotipo Usnayo, cuyas medias de áreas afectadas son: 73,88% y 1.68 % respectivamente. El ecotipo Isla del Sol, se muestra con mayor susceptibilidad frente a los ecotipos Usnayo y Gigante Copacabana, cuyas medias tienen diferencias no significativas en la resistencia a la enfermedad Mancha Chocolate, producida por *Botrytis fabae*. Los resultados de trabajos específicos con Usnayo muestran una favorable resistencia a la enfermedad, esto nos ayuda a saber que también los ecotipos Isla del Sol y Gigante Copacabana gozan de similares aptitudes.

6. La presencia de *Botrytis cinerea* (60,5%) en las muestras obtenidas, nos indica una mayor presencia de esta en las comunidades de donde se obtuvieron las colectas, como también podría ser la sensibilidad del hongo *Botrytis fabae* a las manipulaciones en laboratorio. En campo resultó difícil diferenciarlos, los síntomas producidos por ambos son bastante similares. Solo las observaciones microscópicas permitieron efectuar la diferencia.

7. En base a todo el trabajo realizado se concluye que los ecotipos de haba del Altiplano norte de La Paz, poseen cierto grado de resistencia a la enfermedad producida por *Botrytis fabae*, los cuales podrían ser un aporte bastante significativo en la identificación de fuentes de resistencia. También podrían ser consideradas material promisorio para la obtención de variedades mejoradas.

8. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, a manera de experiencia se recomienda:

1. Con referencia a resistencia, se recomienda efectuar ensayos en huertos atemperados y luego en campo con los ecotipos Usnayo, Isla del Sol y Gigante Copacabana.
2. Para continuar con este estudio, evaluar mayor número de poblaciones de *Botrytis faba* y en diferentes épocas del ciclo biológico, a fin de determinar la existencia de razas.
3. Para trabajos extensos con *Botrytis*, se recomienda la toma de muestras de la planta en la etapa final del cultivo, realizar la pérdida de humedad en ambiente estéril a bajas temperaturas (5°C), sin la incidencia de rayos solares, pues disminuyen considerablemente la presencia del hongo en la misma.
4. Proceder con precaución al trabajar con semilla proveniente de la comunidad de Chañi, en virtud a que la población de *Botrytis fabae* traída de esa comunidad mostró mayor agresividad que las originarias de Tiquina, Suintia Grande y Chirapaca; las cuales pertenecen a zonas productoras de semilla.
5. Se recomienda el uso de semilla de los ecotipos Isla del Sol, Usnayo y Gigante Copacabana para siembras en el Altiplano de La Paz (donde existe mayor incidencia de Mancha Chocolate), por la manifestación de cierto grado de resistencia a la enfermedad producida por *Botrytis fabae*, añadiendo las cualidades en cuanto a rendimiento y calidad de grano.
6. Realizar ensayos más específicos con las poblaciones de *Botrytis fabae*, a fin de determinar las condiciones favorables para la esporulación en cuanto a horas luz y temperatura, por la dificultad en la obtención de esporas.

7. BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G. 1996. Fitopatología: Efecto del ambiente en la producción de las enfermedades infecciosas. Editorial Limusa, S. A. Grupo Noriega Editores. México. pp 356-360.

BARBA, A., LUNA, B. y ROMERO, J. 2001 Micropropagación de Plantas. 107 p.

CENICAFÉ. 1995. Práctica sobre control de calidad a formulaciones de hongos entomopatógenos. Chinchiná, Caldas, Colombia. 33 p.

CHOQUE, E. 2005. Comportamiento Agronómico de tres variedades y tres ecotipos de haba (*Vicia faba* L.), en la comunidad Cumana, Provincia Los Andes, La Paz. Tesis de grado para obtener el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Católica Boliviana "San Pablo" Unidad Académica Campesina Tiahuanaco Ingeniería Agronómica. La Paz, Bolivia. pp110.

COCA MORANTE, M. 2004. Densidad de siembra e incidencia de enfermedades foliares causadas por hongos y rendimiento potencial del cultivo del haba (*Vicia faba* L.) en el Altiplano Norte de La Paz, Bolivia. Facultad de Agronomía, UMSA, La Paz, Bolivia. pp 190 – 192.

COCA MORANTE, M. 2007. La antracnosis del haba (*Vicia faba*). Oficina Regional Semillas La Paz. Boletín técnico Vol 1, N° 1.

CRESPO, M. 1996. Haba (*Vicia faba* L.). En: Las leguminosas en la agricultura boliviana. Cochabamba, Bolivia. 191 p.

De QUITON, H.M. 1994. Principales Enfermedades de haba. p. 59-66. En: Memoria de Seminario Taller sobre Haba de Exportación, Cochabamba, Bolivia.

DE QUITON, M. 2000. Enfermedades de haba. p.66. En Henk Waaijnberg y Milan Caro (ed.) Programa Nacional de Leguminosas de Grano: Resultados de Investigaciones, 1991-1998. Cochabamba Bolivia.

DOMINGUEZ GARCÍA – TEJERO, F. 2004. Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas. 9th ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp 372 – 373.

ELLIS, M. B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England.

HEREDIA, G. 1996. Selección de material de haba con resistencia duradera a enfermedades foliares. p. 9-10. En: Informe Anual 1995-96, Programa Nacional de Leguminosas de grano. Altiplano Norte, La Paz. Instituto Boliviano de Tecnología Agropecuaria. La Paz, Bolivia.

Proyecto INFOAGRO-Bolivia (IICA/GTZ) 2007. La Casa de la Agricultura en Bolivia.(En línea). Disponible en: [http:// www.infoagro.com](http://www.infoagro.com).(Accedido 8 diciembre 2007). La Paz, Bolivia.

MATTOS, G. 2000. Fisiología Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. pp 147.

MAYEA, S. y PADRON, J. 1983 Bacterias y hongo fitopatógenos. 1ra. ed. PUEBLO Y EDUCACIÓN. La Habana Cuba. pp 53-54.

MEDINA, D. 1997. Incidencia de enfermedades foliares en haba y selección de materiales tolerantes a virosis y mancha chocolate. Tesis ing. Agr. Universidad Autónoma Tomás Frías. Potosí, Bolivia. p 118 -119. En: MEMORIAS 1997. 3° Reunión Nacional de Leguminosas y 4° Reunión Boliviana de Rhizobiología. La Paz, Bolivia.

MEIER, U. 1997. Growth Stages of Mono – and Dicotyledonous Plants. BBCH – Monograph, Blackwell Wissenschafts – Verlag Berlin – Wien.

MENESES, R., WAAIJENBERG, H. y PIÉROLA, L. 1996. Las leguminosas en la agricultura boliviana, Proyecto Rhizobiología Bolivia. Cochabamba, Bolivia. 434 p.

MOREIRA, A., MILAN, m., MEDINA, D., SARAVIA, E. y J. GONZÁLES. 1997. Incidencia de virosis y mancha chocolate en haba y selección de materiales tolerantes. p. 116-118. En: Primer taller de PREDUZA en resistencia duradera en cultivos altos en la zona Andina. Quito, Ecuador.

NUNES, C., PIEROBOM, C., ROSETO, E. y LUZZADI, G. 2005. Principales enfermedades de Gramíneas y Leguminosas. p.41-42. En: Curso de especialización en protección de plantas. Santa Cruz, Bolivia.

OSPINA, H. 1984. Técnicas para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 33 p.

PIÉROLA, L. y SILES, F. 2002. Variedades mejoradas de haba del CIFP. Publicación 1. Centro de Investigaciones Fitoecogenéticas de Pairumani, Proyecto AgroLeg (CIAT-CIF-CIFP-SEFO) Cochabamba, Bolivia. 8 p.

PROINPA – PADER 2001 Mercado Internacional del haba, La Paz Bolivia.

TOVAR, N. 1999. Control Biológico de la Broca del Café (*Hypothenemus hampei*) con el Hongo *Beauveria bassiana* B. en la Formulación de Bioinsecticidas. Tesis de grado para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Fac. de Ciencias Agrícolas y Pecuarias, UTO Oruro, Bolivia. 160 p.

UPOV, 2002 Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, Directrices Para la Ejecución del Examen de la Distinción, la Homogeneidad y la Estabilidad, Ginebra. pp 14 – 16.

WAAIJENBER, H. 1996. Las Leguminosas en la agricultura boliviana. Proyecto de Rhizobiología de Bolivia, Cochabamba, Bolivia. p1.

WAIJENBER, H. Y CARO, M. 2000. (eds) Programa Nacional de Leguminosas de Grano: Resultados de investigación, 1991 – 1998. Publicación 108. Proyecto Rhizobiología Bolivia (CIAT-IF-NLG-UAW/DHV). Ediciones Cochabamba, Bolivia. 214 p.

ZEGARRA, S. 1998. Caracterización y clasificación de germoplasma de haba (*Vicia faba* L.). Tesis Ing. Agr. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 163 p.

A N E X O S

ANEXO 1

Velocidad de crecimiento en % (120 Hrs de la inoculación)										
Prueba I										
COMUNIDAD	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Chañi	69,0	70,5	74,5	75,0	75,0	70,5	70,0	74,5	77,0	75,0
Chirapaca	56,0	50,0	56,0	57,0	63,0	45,0	54,0	53,5	40,0	58,0
Tiquina	59,5	53,0	55,5	41,0	51,5	55,0	45,5	46,5	56,0	56,0
Suntia Grande	59,0	65,0	60,5	56,0	60,0	54,0	46,0	59,0	50,0	54,0

Velocidad de crecimiento en % (120 Hrs de la inoculación)										
Prueba II										
COMUN.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Chañi	71,5	77,0	80,0	74,5	71,0	70,0	70,5	71,0	70,0	75,0
Chirapaca	55,0	70,0	70,0	65,0	54,0	63,0	56,0	60,0	60,5	68,0
Tiquina	61,5	60,0	66,0	56,5	45,0	54,0	65,0	62,0	55,0	40,0
Suntia	54,0	52,5	53,5	59,0	53,0	51,5	55,0	52,5	59,0	53,0

Velocidad de crecimiento en % (120 Hrs de la inoculación)										
Prueba III										
COMUN.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Chañi	76,0	60,0	72,0	75,0	56,0	60,5	62,5	70,5	70,5	47,0
Chirapaca	63,0	64,0	43,5	59,5	55,5	62,5	57,0	61,5	64,5	54,0
Tiquina	60,0	41,5	46,5	52,0	59,0	58,5	64,0	52,0	48,0	57,0
Suntia Grande	62,0	49,0	59,0	64,5	64,0	69,0	70,0	76,5	80,5	73,0

ANEXO 2

Velocidad de crecimiento en % (120 Hrs de la inoculación)										
Medias										
COMUN.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Chañi	72,2	69,2	75,5	74,8	67,3	67,0	67,7	72,0	72,5	65,7
Chirap.	58,0	61,3	56,5	60,5	57,5	56,8	55,7	58,3	55,0	60,0
Tiquina	60,3	51,5	56,0	49,8	51,8	55,8	58,2	53,5	53,0	51,0
Suntia	58,3	62,8	57,7	59,8	59,0	58,2	57,0	62,7	63,2	60,0
MEDIA GENERAL						60,5792				

ANEXO 3

Evaluación de resistencia Variedad: Pairumani área del foliolo afectado expresada en %										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1° Prueba	66,4	83,0	58,3	48,0	71,0	96,3	59,5	67,2	61,7	61,4
2° Prueba	87,64	56,0	72,1	54,9	100,0	44,6	84,6	100,0	93,5	66,2
3° Prueba	100	58,1	100,0	73,0	37,0	43,0	100,0	96,5	100,0	76,6
MEDIA	84,68	65,7	76,8	58,6	69,3	61,3	81,4	87,9	85,1	68,1

Evaluación de resistencia Ecotipo: Usnayo área del foliolo afectado expresada en %										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1° Prueba	1,12	0,9	1,95	1,85	1,24	1,86	1,32	1,71	2,02	1,95
2° Prueba	2,01	1,93	0,85	0,97	1,89	1,78	1,72	0,99	0,84	1,06
3° Prueba	1,73	1,85	2,31	2,29	1,92	1,3	2,22	2,31	2,14	2,28
MEDIA	1,62	1,56	1,70	1,70	1,68	1,65	1,75	1,67	1,67	1,76

Evaluación de resistencia Ecotipo: Isla del Sol área del foliolo afectado expresada en %										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1° Prueba	4,59	1,66	2,13	3,14	3,12	3,10	4,01	3,25	3,18	3,29
2° Prueba	3,20	3,24	3,17	3,19	1,35	3,19	1,60	4,40	4,00	2,60
3° Prueba	3,85	3,12	3,21	4,22	1,85	3,57	3,26	1,70	3,35	1,48
MEDIA	3,88	2,67	2,84	3,52	2,11	3,29	2,96	3,12	3,51	2,46

Evaluación de resistencia Ecotipo: Gigante Copacabana área del foliolo afectado expresada en %										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1° Prueba	3,05	1,53	3,27	1,71	2,09	3,08	2,14	1,73	1,90	2,62
2° Prueba	2,65	2,64	2,58	2,13	3,82	2,33	3,35	1,85	1,81	1,64
3° Prueba	2,85	2,49	2,16	1,20	1,05	1,96	2,04	2,32	1,97	1,68
MEDIA	2,85	2,22	2,67	1,68	2,32	2,46	2,51	1,97	1,89	1,98

ANEXO 4

Evaluación de resistencia área del foliolo afectado expresado en % MEDIAS										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
PAIRUM	84,68	65,7	76,8	58,6	69,3	61,3	81,4	87,9	85,1	68,1
USNAYO	1,62	1,56	1,70	1,70	1,68	1,65	1,75	1,67	1,67	1,76
ISLA	3,88	2,67	2,84	3,52	2,11	3,29	2,96	3,12	3,51	2,46
COPA	2,85	2,22	2,67	1,68	2,32	2,46	2,51	1,97	1,89	1,98
MEDIA GENERAL									20,21	

ANEXO 5**Colecta de poblaciones de Botrytis fabae**

Comunidad	Provincia	Depto.	Parte de la planta colectada	Época de colecta
Chañi	Manco Kapac	La Paz	foliolos	maduración, poscosecha
Camacachi	Manco Kapac	La Paz	foliolos y tallo	maduración, poscosecha
Suntia Grande	Omasuyos	La Paz	foliolos	maduración, poscosecha
Chirapaca	Los Andes	La Paz	foliolos y fruto	maduración, poscosecha

ANEXO 6

Paises	Producción habas verdes año 2002 (toneladas)
Argelia	125.000
China	115.991
Chipre	110.000
Marruecos	103.820
España	73.100
Perú	66.085
México	53.000
Ecuador	22.000

Rendimiento de haba en grano seco

País	Rendimiento t/ha
Argentina	9.11
Argelia	0.40
China	2.11
Chipre	1.33
Marruecos	0.70
España	0.75
Perú	1.17
México	0.82
Ecuador	0.86
Bolivia	1.00

Anexo 8

