

Evaluación de la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* cepa BOL 12 QD, frente a *Botrytis fabae*, causante de la mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*)

Biocontroler activity evaluation of *Trichoderma inhamatum* strain BOL 12 QD, against of *Botrytis fabae*, causing of chocolate spot in broad bean cultivations (*Vicia faba*)

Christian Espinal Churata ¹, Marco Huanca ², Enrique Terrazas Siles ¹, Alberto Giménez Turba ¹

¹ Área de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

² Fundación – PROIMPA, Centro de Promoción e Investigación de la Papa, Regional Altiplano. La Paz, Bolivia.

Dirección para correspondencia: Christian Espinal Churata. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia.
E mail: christian_espinalch@yahoo.es

Recibido para publicación en 10/06/10
Aceptado en 30/06/10

RESUMEN

La Mancha Chocolate en el haba, es causada por el fitopatógeno *Botrytis fabae*. Éste se caracteriza por ser muy virulento y reducir hasta dos tercios el rendimiento del cultivo de haba. Así en este trabajo se evaluó la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum*. El antagonismo se evaluó por el método de enfrentamiento dual, donde se observó micoparasitismo y antibiosis. Se evaluó la influencia de parámetros físicos, químicos y biológicos sobre el cultivo en batch de *T. inhamatum* y la capacidad de estos sobre el control de *B. fabae*. Al emplearse filtro de luz violeta el porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae* fue de 52.84 %. Bajo el parámetro de agitación se reportó 61.11% de inhibición. Cuando se adicionó nitrato de amonio al medio de cultivo, la inhibición fue 11.52 %. Al emplear cáscara de papa a una temperatura de 22 °C y pH 5, se observó 54.74 % de inhibición. En el co-cultivo con esporas de *T. inhamatum* (10⁶ prop/mL) con *B. fabae* (10² prop/mL), la inhibición fue 51.21 %. Al emplear biomasa de *B. fabae* (500 mg) con *T. inhamatum* (10⁶ prop/mL) la inhibición fue 55.11 %. La aplicación del fermento de *T. inhamatum*, sobre las plántulas de haba presentó significancia (p≤0.05), sobre las variables: peso de plántula, longitud de vaina, número de vaina, peso de vaina, número de grano, peso de grano verde y peso de grano seco, respecto los tratamientos biológicos (Tricobio, Biosulfocal y esporas de *Trichoderma spp*).

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

ABSTRACT

Chocolate spot disease in the broad bean is caused by the fungus *Botrytis fabae*. This fungus is well characterized as a virulent and can reduce until two thirds the yield of the broad beans cultivation. Thus, in the present work the biocontroler activity of *Trichoderma inhamatum* was evaluated. The antagonism was evaluated by dual confrontation method, in which micoparasitism and antibiosis were observed. The influences of physical, chemical and biological parameters were evaluated in batch cultures of *T. inhamatum* and the ability of these in the control of *B. fabae*. When a filter of violet light was used, the *B. fabae* growth was inhibited in 52.84%. The batch cultures the under shake up the inhibition was 61.11 %. When ammonium nitrate was added to the culture medium, the inhibition was 11.52%. When potato husk was added in the culture medium, at 22 °C and pH 5, the inhibition was 54.74 %. In the co-culture with spores of *T. inhamatum* (10⁶ prop/mL) with *B. fabae* (10² prop/mL), had inhibition of 51.21%. When using biomass of *B. fabae* (500 mg) with *T. inhamatum* (10⁶ prop/mL) the inhibition was 55.11%. The application of the ferment of *T. inhamatum* BOL 12 QD, on the broad bean plant shows a significant control of the disease (p ≤ 0.05), on the variables: plant weight, husk longitude, husk number, husk weight, grain number, weight of

green grain and weight of dry grain, concerning the biological treatments (Tricobio, Biosulfocal and spores of *Trichoderma spp.*).

Key Words: Chocolate spot, *Botrytis fabae*, *Trichoderma inhamatum*, Micoparasitism, Antibiotic

INTRODUCCIÓN

El cultivo de la haba (*Vicia faba*) se constituye en uno de los más importantes económicamente, para Bolivia y una de las fuentes principales tanto de alimentación como de comercio, de la población andina rural. La superficie cultivada a nivel nacional esta cerca de 31000 Ha (anual), dedicándose a este cultivo unas 200.000 familias, según el Instituto Nacional de Estadística (INE). Aunque el consumo en la región altiplánica, anualmente supera las 35.000 TM, su exportación en la gestión 2006 originó un ingreso 848.268 dólares, teniendo como destinos principales: Italia, Estados Unidos, Japón, Portugal y Francia según el Instituto Boliviano de Comercio Exterior (IBCE), por lo que se

abren nuevas expectativas para incrementar la producción de esta oleaginosa. Por lo citado, se observa a la producción de haba como un negocio bastante rentable, y en cierta medida lo es, pero, existen limitantes en su cultivo, tal es el caso de las enfermedades fitopatógenas, que limitan su producción. Uno de estos fitopatógenos, es *Botrytis fabae*, hongo característico en la patogenicidad del haba que produce la Mancha Chocolate. Este patógeno puede reducir hasta dos tercios los rendimientos del cultivo. La enfermedad se desarrolla rápidamente bajo condiciones de humedad y temperaturas comprendidas entre 15 y 22°C¹. En las fase de desarrollo inicial del cultivo, la enfermedad se puede presentar en forma de manchas características de color chocolate sobre las hojas (fase no agresiva) (Figura 1.A), posteriormente alcanza a los tallos flores y vainas. En la fase agresiva de la enfermedad (floración, formación y maduración de vainas), las partes afectadas se ven como manchas necrosadas con abundante formación de una felpa de color gris marrón (Figura 1.B).



Figura 1. Sintomatología de la mancha Chocolate. A. Síntomas iniciales de la infección mancha Chocolate (fase no agresiva). B. Infección del fruto ocasionado por *Botrytis fabae* (fase agresiva). C. Vista Panorámica de cultivo de haba infectada por la mancha chocolate. (Chua Cocani – 2008 - Fotos tomadas por el equipo de investigación-del IIFB).

Para el control de esta enfermedad existen diferentes tipos de tratamientos mediante agroquímicos como: Mancozeb, Folpet, Selix, Benomyl, etc, que son usados frecuentemente.

Las políticas de salubridad, han limitado ya el uso de alguno de estos agentes químicos en la producción agrícola, debido a que no sólo ocasionan un control de la enfermedad, sino que también son precursores del deterioro del medio ambiente (alteraciones en aire, tierra, agua y animales), daño en la salud tanto del productor como del consumidor (alteraciones apoptóticas, formación de radicales de oxígeno y leucemias)² y ocasionando la fungoresistencia. Si consideramos las normas vigentes de exportación y el uso indiscriminado de agroquímicos, coartaríamos la exportación de este producto, y se originaría un fracaso económico, no sólo para el agricultor, sino que también para mercado nacional.

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

Uno de estos microorganismos es *Trichoderma sp.*, hongo de características asexuales, que se encuentra en todo tipo de suelos y zonas climáticas. Éste es un invasor oportuno secundario, y se caracteriza por presentar esporas resistentes, generadoras de enzimas hidrolíticas (celulasas, quitinasas, glucanasas, etc), metabolitos con capacidad antibiótica³, y su capacidad de confrontación directa con patógenos, originando el micoparasitismo⁴ y antibiosis⁵, cualidades que hacen a este hongo ideal para el control de enfermedades.

Es en tal razón, que en el presente trabajo se pretende evaluar la actividad biocontroladora de *Trichoderma inhamatum* (cepa BOL 12 – QD), frente a *Botrytis fabae*, causante de la Mancha Chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Hongo patógeno:

Procedencia y aislamiento del patógeno *B. fabae*. El aislamiento se realizó a partir de hojas de haba infectadas con *Botrytis fabae* (Mancha Chocolate), obtenidas de las parcelas de cultivo en la comunidad Chua Cocani de la Provincia Omasuyos del Departamento de La Paz. (Ver Figura 1.C)

Para el aislamiento se realizó la asepsia de las hojas sometiéndolas a una solución de etanol al 70% por 30 segundos, trasvasándolas luego en agua estéril por 20 segundos y secando éstas sobre papel filtro. Una vez

secas, se realizó cortes de diferentes tamaños con bisturí de las secciones que presentaban la enfermedad, posteriormente fueron sembradas en cajas Petri con medio de cultivo Agar Patata Dextrosa (250 g/L papa, 10 g/L glucosa, 15 g/L agar-agar) (PDA) e incubadas a 22 °C.

Reproducción del efecto patógeno en plantas (postulados de Koch modificado por el autor). Se realizó sobre hojas sanas de haba. Se colocó las hojas tanto de haz y del envés en caja Petri (que contenía en su base algodón y papel filtro humedecida con agua estéril), se procedió a lesionar mediante cortes con bisturí las hojas de haba (aproximadamente 5 mm). Al grupo de prueba se inoculó 20 µL de una suspensión de esporas del patógeno, a una concentración de 10⁶ propágulos./mililitro (prop/mL) (calculado en cámara de Neubauer), del mismo modo se inoculó 20 µL de agua estéril al grupo control. Se colocó de dos a seis hojas por caja Petri, tanto en el grupo control como en el de prueba, estas pruebas se realizaron por triplicado. Una vez observado el signo de enfermedad sobre las hojas de haba, se procedió nuevamente a aislar al hongo patógeno, en medio PDA.

Identificación del hongo patógeno. Para la identificación se analizaron las características morfológicas y microscópicas. Esta última se realizó, tomando una muestra de la superficie de la caja Petri en la que se aisló al patógeno, con un fragmento de cinta adhesiva transparente que se la colocó sobre un portaobjeto, el cual contaba con una gota de azul de metileno y se observó al microscopio.

Hongo biocontrolador:

Procedencia del hongo biocontrolador. La cepa utilizada en el presente trabajo fue *Trichoderma inhamatum* BOL – 12 QD procedente del cepario del IIFB - UMSA.

Evaluación de la actividad biocontroladora:

Prueba de interacción patógeno – antagonista. Se sembró en placa Petri sobre medio de cultivo PDA, un disco de micelio de 5 mm de diámetro (obtenida mediante sacabocado) del patógeno diametralmente opuesto a uno del antagonista, considerándose 3 repeticiones por prueba.

Producción de metabolitos secundarios antagonistas. Se evaluó, aspectos físicos, químicos y biológicos del cultivo de *T. inhamatum* para la producción de metabolitos secundarios durante 30 días. Con estos cultivos se determinó la actividad biocontroladora sobre *B. fabae* determinando el crecimiento hifal durante 5 días.

Parámetros físicos:

Evaluación del efecto de luz sobre *T. inhamatum* BOL – 12 QD. Se empleó viales de 100 mL, a los cuales se alicuotó un volumen de 50 mL de caldo de cultivo PDC (250 g/L papa, 5 g/L glucosa), que fueron esterilizados en un autoclave (AH, American, Model N° 258 MALTOWOE; WI:54220) a 120 °C y 1,5 atm por 20 minutos. Una vez frío el medio de cultivo se procedió a inocular 1 mL de suspensión de esporas *T. inhamatum* a una concentración de 10^6 prop/mL, posteriormente se procedió a forrar los viales con papel celofán verde, violeta y papel aluminio. Como control se empleó al grupo que no contaba con filtro, debido a que los viales eran transparentes. Se consideraron 5 repeticiones por prueba y la actividad se evaluó a los 30 días. Con estos cultivos se realizó pruebas de inhibición sobre *B. fabae* durante 5 días

Implementación de agitación y aeración en los medios de cultivo. Se realizó, empleando una bomba de pecera, la cual descargaba el aire a una presión de 20 PSI (medido por un barómetro Cole – Parmer) sobre un matraz que contenía ácido clorhídrico 0.1 N, éste a su vez estaba conectado a dos matraces, los cuales contenían 250 mL de medio PDC con esporas de *T. inhamatum* a 10^6 prop/mL. Uno de los matraces al margen de estar sometido a la aeración, se encontraba bajo agitación mediante un agitador (Fisatan, Agitador Magnético 144524. Brasil). Como controles se emplearon medios que estaban en agitación y estanco, la actividad controladora se evaluó a los 30 días.

Parámetros químicos:

Evaluación de la adición de nitrato de amonio en el caldo de cultivo PDC. Se empleó viales de 100 mL, a los cuales se alicuotó un volumen de 50 mL de caldo de cultivo PDC (adicionado con 1 g/L de nitrato de amonio). Este caldo de cultivo fue esterilizado. Una vez frío, se procedió a inocular 1 mL de suspensión de esporas de *T. inhamatum* de 10^6 prop/mL. Luego se procedió a forrar los viales como se describe en los parámetros físicos de luz. La evaluación de la actividad controladora se realizó a los 30 días, se consideraron 5 repeticiones por prueba.

Evaluación de Temperatura, Fuente de Carbono y pH. Este procedimiento se realizó mediante diseño factorial 3^3 en donde se probaron diferentes fuentes de carbono temperatura y pH. En la preparación de los medios de cultivo se empleó 250 g/L de papa, 250 g/L de cáscara de papa y 100 g/L de aserrín, a las que se adicionó 5 g/L de glucosa. El ajuste del pH se realizó adicionando ácido clorhídrico 0.1 N. El pH se midió

mediante un equipo pH portátil, pHmetro HI 824 (HANNA Instruments).

Las fuentes de carbono se alicuotaron en viales de 100 mL y se adicionó 1 mL de suspensión de *T. inhamatum* a 10^6 prop/mL. Se consideraron 3 repeticiones por prueba. La actividad se evaluó a los 30 días.

Parámetros Biológicos:

Co – cultivo del patógeno mediante el uso de esporas. Se emplearon 27 viales de 100 mL, en los cuales se alicuotó 50 mL de medio PDC, que fueron esterilizados, luego se inoculó *T. inhamatum* a concentraciones de 10^2 , 10^4 y 10^6 prop/mL. Pasado 7 días de realizado el inoculó inicial, se procedió a inocular concentraciones de 10^2 , 10^4 y 10^6 pro/mL de *B. fabae*. En este modelo experimental se empleó un diseño factorial de tipo 3^2 . La actividad controladora se evaluó a los 30 días y se consideraron 3 repeticiones por prueba.

Co – cultivo del patógeno mediante el uso de biomasa. Del igual forma se emplearon 27 viales de 100 mL, en los que se pesaron 250 mg, 500 mg y 750 mg de biomasa atenuada de *B. fabae* (se obtuvo previa fermentación de 30 días), posteriormente se añadió 50 mL de medio PDC y fue esterilizado. Luego se inoculó *T. inhamatum* a concentraciones de 10^2 , 10^4 y 10^6 prop/mL. En este modelo experimental se empleó un diseño de tipo 3^2 , la actividad controladora se evaluó a los 30 días y se consideraron 3 repeticiones por prueba.

Actividad biocontroladora del fermento. Se centrifugó el fermento de los medios en batch de estudio a 12000 rpm por 5 minutos, en una centrifugadora refrigerada (Modelo 2-16PK – GERMANY) a 5 °C, y se filtró en nitrocelulosa de 0.2 μ m. Se procedió a realizar la prueba de dilución en placa, mezclando el filtrado con agar a una dilución 1 en 1, el cual se vertió en cajas Petri de 10 mL. Una vez agarizado, mediante un sacabocado, se retiró agar de la parte central de la caja, en la que se inoculó al patógeno a una concentración de 10^6 prop/mL de *B. fabae*, y se incubó a 22 °C. Como control se empleó el fungicida Mancoceb, y agua destilada estéril. El crecimiento se midió cada 24 horas en 8 direcciones.

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

Para este objeto se empleó una botellón de un volumen de 30 L, el cual fue esterilizado previa utilización, se empleó 20 L de medio PDC. Se añadió una suspensión de 10 mL de *T. inhamatum* BOL – 12 QD a una concentración de 10^6 prop/mL, este procedimiento se llevó a cabo en campana de flujo laminar estéril.

Evaluación de la actividad del fermento *T. inhamatum* BOL - 12QD en las parcelas de haba (Prueba de campo). Realizado en la comunidad Chua Cocani, perteneciente a la provincia Omasuyos del departamento de La Paz, ubicada a 50 Km. de la ciudad de La Paz a una altura de 3830 msnm.

Diseño del terreno de experimentación, ecotipos de estudio y tratamientos. El área de estudio se encontraba geográficamente a 16°11'589" latitud sur, 68°44'33" longitud oeste y a una altura de 3834 msnm. La superficie del terreno fue de aproximadamente 896 m², la cual se dividió en dos segmentos de 448 m². En la primera fracción del terreno, se sembró el ecotipo de haba Isla del sol, y en la segunda el ecotipo Gigante Copacabana, como separación entre ambos ecotipos, se dejó dos surcos. Para la prueba de los tratamientos sobre los ecotipos, se procedió a dividir ambos segmentos del terreno en grupos de tratamiento teniendo un total de 5 tratamientos por ecotipo (control, Tricobio, Biosulfocal, fermento de *T. inhamatum* 12 QD y esporas de *Trichoderma spp.*). A su vez cada parcela se dividió en 3 unidades experimentales, compuesta de ocho surcos de manera de tener 3 repeticiones por tratamiento. Por cada unidad experimental se tomó a seis unidades individuales para el análisis respectivo, de un total de 2400 plántulas de haba. Para establecer el orden de los tratamientos, se realizó un procedimiento al azar con la función RND de una calculadora (CASIO POWER GRAPHIC fx - 7400G PLUS).

Preparación de los tratamientos:

Tricobio Cochabamba. En su aplicación se empleó: 1 L. de la suspensión de tricobio disuelto en 15 L de agua.

Biosulfocal. Compuesto por Ca (OH)₂ al 5.55 % y azufre al 11.10 %, la forma de aplicación es de: 1 L de biosulfocal disuelto en 15 L de agua.

***Trichoderma inhamatum* cepa BOL – 12 QD.** Se aplicó a una concentración de 1 en 2 (1 L. de fermento de *T. inhamatum* BOL - 12 QD disuelto en 2 L de agua).

Esporas *Trichoderma spp.* Cochabamba. Se resuspendió 1 Kg. este producto en 5 L. de agua, luego se tamizó, para separar los granos de arroz con los que viene.

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

Aplicación de los tratamientos:

Se realizaron cuatro aplicaciones de los diferentes tratamientos, los intervalos de tiempo fueron aproximadamente entre 15 y 20 días, siendo la primera el 15 de diciembre de 2008 y la última el 30 de enero de 2009, a partir de la germinación de la plántula.

Cosecha de las unidades experimentales. Previa cosecha, se procedió a realizar un análisis individual de la madurez fisiología de las plántulas, tomando en cuenta las variables: altura, peso de plántula, número de vaina, longitud de vaina, peso de vaina, número de grano por plántula, peso del grano por plántula, peso grano seco por plántula, severidad de la infección.

Cosecha del producto por tratamiento y ecotipo. Se empleó el método de calcha, característico en las comunidades rurales como método de cosecha para el grano seco. En nuestro procedimiento apilamos 10 calchas, de acuerdo a los tratamientos empleados por ecotipo.

Trillado y venteado. La trilla se realizó cuando las calchas estuvieron completamente secas, ésta se realizó por separado de acuerdo al ecotipo y tratamiento. Las trillas del grupo de estudio compuesto por diez calchas, fueron desgranadas en forma tradicional, empleando jauk'añas. Posterior a la trilla se realizó el venteo en forma manual, separando de esta manera la broza del grano, se evaluó el rendimiento total, producido por los tratamientos y ecotipo, mediante una romanilla Pocket balance de 25 Kg.

Análisis de datos:

El análisis estadístico se realizó por la prueba de ANOVA simple de doble vía, empleando el software STATISTICA 7.0. Los niveles de probabilidad menores de 0.05 fueron considerados como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Hongo patógeno:

Aislamiento e identificación del patógeno *B. fabae*. El hongo identificado como causante de la Mancha Chocolate fue *Botrytis fabae*. En los postulados de Koch (Figura 2), se observa el mismo efecto patogénico característico por la aparición de una mancha de tono café.

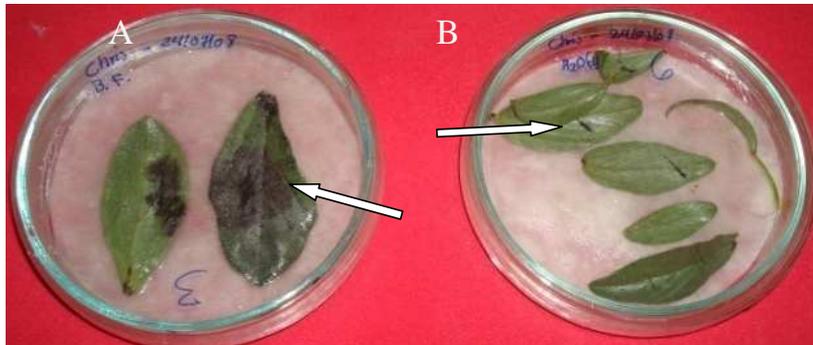


Figura 2. Postulados de Koch. A. Inicio de la infección causada por *B. fabae* luego de 5 días. B. Control inoculado con agua estéril donde no se observa infección alguna a los 5 días, (IIFB – 2008).

Identificación del hongo patógeno. Se evaluó las características morfológicas presentadas en el medio PDA: Lado anverso, presentó un aspecto de frente hifal seco, con formación de macro estructuras sexuales

presentes en forma de esclerotos, respecto al medio es incoloro. Lado reverso, presentó un aspecto de frente hifal liso sin pigmentación (Figura 3).

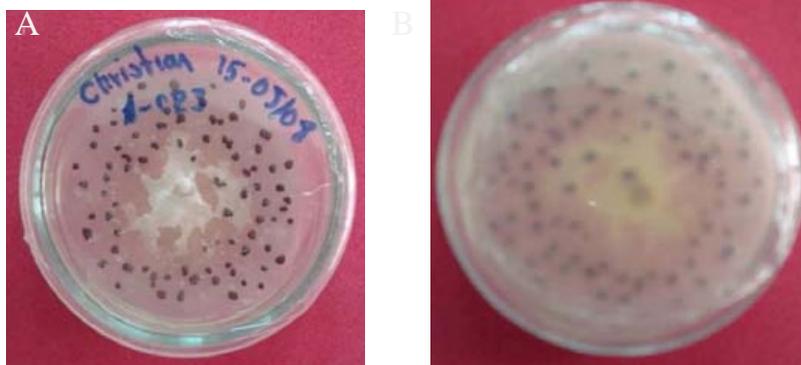


Figura 3. Características morfológicas de *B. fabae*; A. Lado anverso. B. Lado reverso, (IIFB – 2008).

Evaluación de la actividad biocontroladora:

Prueba de interacción patógeno – antagonista. Se observó una inhibición por contacto por parte de *T.*

inhamatum, con la formación de un halo alrededor de *B. fabae*, inhibiendo su crecimiento (Figura 4).

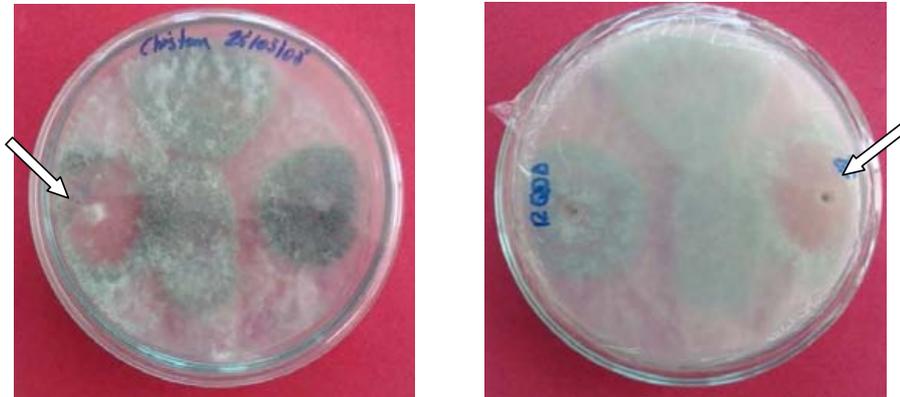


Figura 4. Inhibición por contacto de *T. inhamatum* sobre el patógeno *B. fabae* luego de 15 días. Obsérvese la formación del halo de inhibición y un crecimiento acelerado por parte del controlador (*T. inhamatum*), (IIFB – 2008).

Evaluación de la producción de metabolitos secundarios antagonistas

Parámetros Físicos:

Evaluación del efecto de luz sobre *T. inhamatum* cepa BOL – 12 QD. El empleo de filtros de luz sobre los

medios en estanco, influyeron en la producción de metabolitos secundarios como se observa en la Tabla 1, en la que el filtro lila originó una inhibición de 52.84 % en el crecimiento de *B. fabae*.

Tabla 1. Efecto de distintos filtros de luz sobre la producción de metabolitos secundarios en cultivos de 30 días por *T. inhamatum* y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, durante 5 días de experimentación (IIFB – 2008).

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

* (p ≤ 0.05)

Implementación de agitación y aeración en los medios de cultivo. Bajo el parámetro de agitación, se

originó una inhibición de 67.11 % en el crecimiento de *B. fabae* (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación de la actividad de los cultivo en batch sometidos a parámetros físicos (1: Agitación – aeración; 2: Aeración; 3: Agitación; 4: Estanco), sobre la producción de metabolitos secundarios por *T. inhamatum* BOL 12 – QD en cultivos de 30 días y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, durante 5 días de experimentación, (IIFB – 2008).

		Características de crecimiento e inhibición de <i>B. fabae</i> durante 5 días		
Parámetro Físico	Control	Velocidad de crecimiento (día)	Crecimiento hifal máximo (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
-	<i>B. fabae</i>	5,10	25,34	-
-	Mancoceb	-	-	100,00
1	-	4,22	21,12	16,66
2	-	2,68	10,70	57,76*
3	-	2,08	8,33	67,11*
4	-	3,69	14,76	41,74

* ($p \leq 0.05$)

Parámetros Químicos:

Evaluación de la adición de nitrato de amonio. La adición de nitrato de amonio sobre el medio de cultivo

PDC, dio como resultado un efecto negativo en la producción de metabolitos como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto de la luz y la adición de Nitrato de Amonio al medio PDC, sobre la producción de metabolitos secundarios por *T. Inhamatum* y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae* (IIFB – 2008).

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

Efecto de la fuente de carbono, temperatura y pH. El empleo de cáscara de papa como fuente de carbono a una temperatura de 22 °C y pH 5, tuvo un efecto de biocontrol del 54,74 %, sobre el crecimiento de *B. fabae*.

Del mismo modo, al emplear papa como fuente a carbono a 22°C y pH 5, se inhibió el crecimiento de *B. fabae* en 52.01 % (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la fuente de carbono, temperatura y pH, sobre la producción de metabolitos secundarios y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, (IIFB – 2008).

Control	Fuente Carbono	Temperatura °C	pH	Características de crecimiento e inhibición de <i>B. fabae</i> durante 5 días		
				Velocidad de crecimiento (día)	Crecimiento hifal máximo (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
<i>B. fabae</i> PDA	-	-	-	5,1	25,34	-
Mancoceb	-	-	-	-	-	100,00
	Papa	4	3	4,54	22,68	10,48
	Papa	4	4	4,11	20,56	18,88
	Papa	4	5	4,37	21,87	13,70
	Papa	22	3	3,2	14,39	43,21
	Papa	22	4	3,15	12,6	50,29*
	Papa	22	5	3,17	12,16	52,01*
	Papa	37	3	3,93	19,65	22,47
	Papa	37	4	3,73	18,65	26,40
	Papa	37	5	3,81	19,07	24,76
	Cáscara de papa	4	3	4,34	21,68	14,45
	Cáscara de papa	4	4	4,26	21,29	15,98
	Cáscara de papa	4	5	4,11	20,53	19,00
	Cáscara de papa	22	3	3,03	13,65	46,14
	Cáscara de papa	22	4	3,08	12,54	51,3*
	Cáscara de papa	22	5	2,93	11,72	54,74*
	Cáscara de papa	37	3	3,8	19,02	24,94
	Cáscara de papa	37	4	3,73	18,65	26,39
	Cáscara de papa	37	5	3,14	15,7	38,04
	Aserrín	4	3	4,8	22,68	5,24
	Aserrín	4	4	4,91	20,56	3,05
	Aserrín	4	5	4,73	21,87	6,59
	Aserrín	22	3	3,49	15,99	31,16
	Aserrín	22	4	3,68	15,75	27,38
	Aserrín	22	5	3,15	15,58	37,91
	Aserrín	37	3	4,14	19,65	18,29
	Aserrín	37	4	4,75	18,65	6,24
	Aserrín	37	5	4,05	20,27	20,02

* ($p \leq 0.05$)

Los factores: fuente de carbono, temperatura y pH, influyeron en la producción de metabolitos secundarios

y éstos a su vez, incrementaron la capacidad controladora del fermento como se observa en los porcentajes de inhibición (Figura 5).

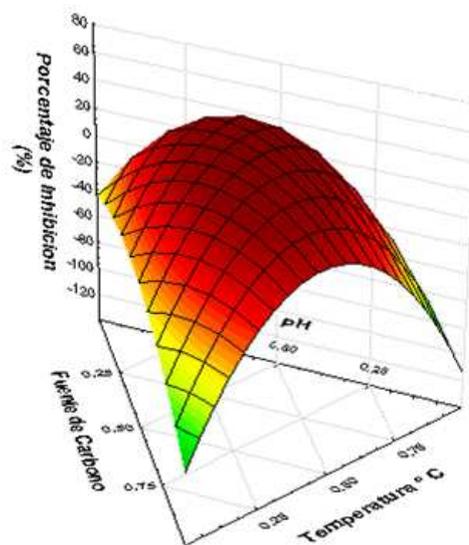


Figura 5. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, originado por efecto del fermento de *T. inhamatum* BOL - 12 QD, producido a diferentes: fuentes de carbono, temperatura y pH, (IIFB - 2008). El análisis fue realizado con el programa STATISTIC.

Parámetros Biológicos:

Co – cultivo del patógeno mediante el uso de esporas.

A una concentración de 10^2 prop/mL de *T. inhamatum* y

10^6 prop/mL de *B. fabae* el porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de *B. fabae*, fue de 51.21 % (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la concentración de propágulos de *T. inhamatum* y *B. fabae*, sobre la producción de metabolitos secundarios de *T. inhamatum* BOL 12 – QD y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*. (IIFB – 2008).

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

* ($p \leq 0.05$) interacción concentración de prop/mL (*T. inhamatum* y *B. fabae*)

Las concentraciones extremas de propágulos tanto del controlador como del patógeno, reflejaron una mejor adaptación de *T. inhamatum* sobre el sustrato del medio

de cultivo y por tanto una mejor producción de metabolitos con actividad controladora (Figura 6).

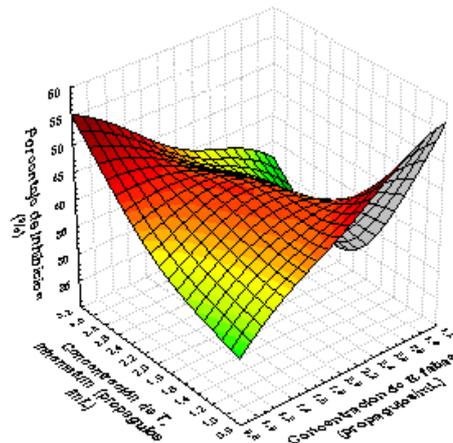


Figura 6. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto del fermento de *T. inhamatum*, producido a diferentes concentraciones prop/mL de *B. fabae*, y *T. inhamatum*, (IIFB – 2008). EL análisis fue realizado con el programa STATISTIC.

Co – cultivo del patógeno mediante el uso de biomasa atenuada. Mediante el empleo de biomasa de *B. fabae* se observó que éste ejerce un efecto inductor sobre *T. inhamatum* en la formación de metabolitos secundarios,

aunque a diferencia de la prueba con concentraciones de propágulos, la concentración media de biomasa (500 mg), es la que presentó el mejor resultado de inhibición (Tabla 6, Figura 7).

Tabla 6. Efecto de la concentración de prop/mL de *T. Inhamatum* y de biomasa de *B. fabae*, sobre la producción de metabolitos secundarios y su influencia en la inhibición del crecimiento *B. fabae*, a los 30 días de experimentación (IIFB – 2008).

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

* ($p \leq 0.05$) interacción concentración y biomasa

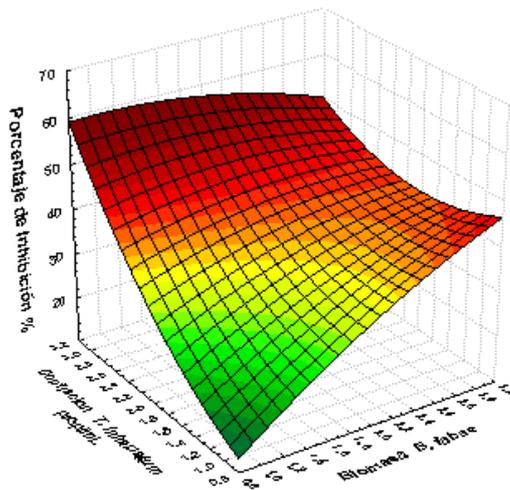


Figura 7. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, ocasionado por efecto del fermento de *T. inhamatum*, producido a diferentes concentraciones de biomasa de *B. fabae* y propopágulos/mililitro de *T. inhamatum*, (IIFB – 2008). EL análisis fue realizado con el programa STATISTIC

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

Al realizar el análisis de las variables se observó que si bien existe una marcada diferencia en la altura de la variedad Gigante Copacabana con el tratamiento de biosulfoc, para un nivel de confianza de ($p \leq 0.05$), esta impresión no tiene significancia alguna respecto al tratamiento y el ecotipo de haba. De igual manera en la variedad Isla del Sol el cuadro no es diferente, mas al contrario, a diferencia del anterior caso en esta variedad se observó que las alturas no varían en más de 10 cm, siendo las medias similares respecto al testigo (sin tratamiento) (Tabla 7).

En lo que respecta al peso de las plántulas de haba, no se encontró interacción alguna, pero respecto al tratamiento se pudo observar que existe un resultado significativo ($p \leq 0.05$). El mayor peso reportado en la variedad Gigante Copacabana, fue con el tratamiento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD con 1,277 g, seguido del tratamiento con Tricobio (Tabla 7). En la variedad Isla del Sol el mayor peso fue obtenido por el tratamiento con Tricobio, seguido del tratamiento con esporas de *T. inhamatum sp.* En el análisis del número de ramas, se pudo observar que los resultados, presentan una mayor dispersión, pero a pesar de eso, no se pudo catalogar a estos resultados como significativos. En el análisis de la longitud de vaina en plántulas de haba, se observó que efectivamente existe un predominio significativo ($p \leq$

0.05) respecto el tratamiento, pero según el ecotipo no se reporta mayor significancia.

El tratamiento que presentó una mayor longitud en vaina en el ecotipo Gigante Copacabana fue de *T. inhamatum* BOL – 12 QD; del mismo modo en la variedad Isla del Sol, este tratamiento presentó el mejor resultado en longitud de vaina.

Respecto al número de vainas, éste se halla influenciando significativamente ($p \leq 0.05$) tanto por el ecotipo como por los tratamientos aplicados. La mejor producción reportada fue en la variedad Gigante Copacabana con el tratamiento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD (Tabla 7). En el ecotipo isla del sol el mejor tratamiento se detectó con la aplicación del controlador Tricobio.

El peso de vaina se vio influenciado significativamente ($p \leq 0.05$), tanto por el tratamiento aplicado como por el ecotipo de haba. Se pudo observar que el tratamiento con *T. inhamatum* BOL 12 – QD en el ecotipo Gigante Copacabana, presentó el mejor resultado respecto el peso de vaina (Tabla 7). La variedad Isla del Sol, presentó el mejor resultado con el tratamiento de Tricobio, si bien este resultado es el mejor obtenido en este ecotipo, no supera el peso obtenido por el tratamiento de *T. inhamatum* BOL 12 – QD en el ecotipo Gigante Copacabana.

El número de grano verde por plántula de haba, se vio influenciado estadísticamente ($p \leq 0.05$) sólo por el tratamiento. Con *T. inhamatum* BOL – 12 QD, se obtuvo el mayor número de grano verde de haba, tanto en la variedad Gigante Copacabana como en la variedad

Isla del Sol, obteniendo esta última el mejor resultado reportado en este experimento, ya que supera ampliamente al segundo de la prueba, que en este caso pertenece al ecotipo Gigante Copacabana, bajo el tratamiento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD (Tabla 7).

En el análisis del peso de grano verde por plántula de haba, se presentó un resultado estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$), para el tratamiento y los ecotipos. *T. inhamatum* BOL – 12 QD, presentó el mejor resultado respecto al peso de grano verde en el ecotipo Gigante Copacabana, seguido del controlador Tricobio. En la variedad Isla del Sol, el tratamiento con Tricobio presentó el mejor peso reportado, seguido del fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD (Tabla 7).

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

por el tratamiento. En la variedad Gigante Copacabana el mejor resultado en peso seco respecto el tratamiento fue del fermento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD seguido por tratamiento con Tricobio. La variedad Isla del Sol reportó como mejor resultado, al tratamiento realizado por Tricobio, seguido por el fermento de *T. inhamatum* BOL – 12 QD (Tabla 7).

El porcentaje de severidad no presentó significancia alguna ($p \leq 0.05$) a la conclusión de de la madurez fisiológica (Tabla 7). Este aspecto puede deberse, a que una vez iniciado el periodo de floración de la plántula de haba, se hace imposible el ingreso a la parcela de experimentación para hacer el seguimiento de las unidades experimentales, pues al hacerlo se ocasionaría un deterioro en la producción. Este aspecto se observó en una experimentación anterior, al realizar las primeras pruebas de la actividad del hongo *T. inhamatum* BOL – 12 QD respecto a fungicidas químicos.

Tabla 7. Evaluación de la altura, peso, número de ramas, longitud de vaina, número de vaina, peso de vaina, número de grano verde, peso de grano verde, peso de grano seco y porcentaje de severidad de 90 plántulas de haba, según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica (121 días), (Chua Cocani – 2009).

Variable	Tratamientos									
	Testigo		Tricobio		Biosulfocal		BOL - 12 QD		Trichoderma CBBA	
	Gigante Copacabana	Isla del sol								
Altura de plántula (cm)	143,00	138,33	159,00	144,33	214,44	154,33	155,22	151,78	138,56	138,22
Peso de plántula (g) ^b	630,00	521,44	1.048,78	1.164,78	982,11	723,24	1.277,11	861,89	981,78	938,89
Número de ramas	4,00	4,22	4,44	6,33	4,44	3,89	4,67	4,56	4,22	5,11
Longitud de vaina (cm) ^a	13,11	11,12	12,89	12,39	12,00	13,06	13,44	13,56	13,44	12,67
Número de vaina ^c	19,56	21,22	30,44	31,89	31,00	20,78	38,11	21,89	35,56	27,56
Peso de vaina (g) ^c	308,00	318,67	574,78	578,33	550,22	376,51	724,89	466,44	619,44	455,89
Número grano verde ^a	36,89	32,44	66,11	64,44	64,00	48,78	74,44	191,44	63,44	47,78
Peso grano verde (g) ^c	132,98	125,67	243,31	254,56	224,08	136,89	311,58	195,33	258,50	179,11
Peso de grano seco (g) ^c	49,86	34,63	84,92	90,82	77,20	56,18	106,33	72,23	96,38	53,67
Porcentaje de severidad	19,44	17,78	14,56	25,11	18,33	22,78	14,44	13,33	13,89	8,67

^(a) ($p \leq 0.05$) tratamiento. ^(b) ($p \leq 0.05$) ecotipo. ^(c) ($p \leq 0.05$) ecotipo – tratamiento
 Los datos expresados en la tabla son resultados obtenidos del promedio de 90 plántulas.

De acuerdo al rendimiento total de grano seco por calcha, se observó que tanto en el ecotipo Gigante Copacabana como en Isla del Sol, el tratamiento con

Biosulfocal y *T. inhamatum* BOL - 12 QD, reportaron los mejores resultados de rendimiento (Tabla 8, Figura 8).

Tabla 8. Evaluación del peso de grano seco por parcelas (kilogramo/Hectárea), según ecotipo y tratamiento, a la conclusión de la madurez fisiológica y secado de las calchas (155 días), (Chua Cocani – 2009).

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

^(c) (p ≤ 0.05) ecotipo – tratamiento

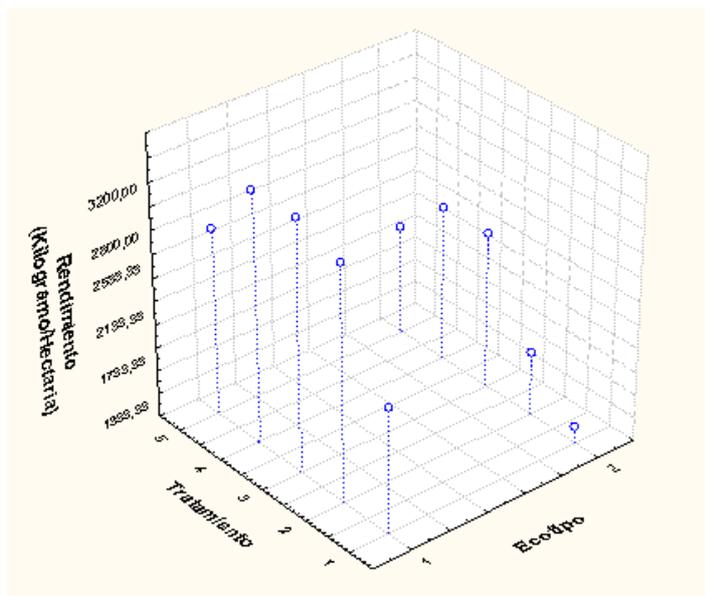


Figura 8. Efecto de los ecotipos (1: Gigante Copacabana, 2: Isla del Sol) y tratamientos (1: Testigo, 2: Tricobio, 3: Biosulfocal, 4: *Trichoderma inhamatum* BOL 12 – QD, 5: Esporas *Trichoderma sp*) sobre el rendimiento total de la parcela de estudio, (Chua Cocani – 2009).

DISCUSIÓN

Para la determinación del microorganismo causante de la Mancha Chocolate, las bases fueron los parámetros estudiados por Ciancas⁶, el cual había trabajado con *Botrytis cinerea* como agente causal de la misma afección, pero de acuerdo a las características citadas por Aleu⁷ y Sahilea⁸, se identificó al microorganismo aislado, como *Botrytis fabae* (Figura 2).

La prueba de enfrentamiento dual, es una prueba en la que se observa las características de: crecimiento, adaptación y capacidad biocontroladora – defensa, tanto del hongo patógeno como del antagonista. Si bien existe

una inhibición en el crecimiento de *B. fabae*, por la acelerada asimilación de nutrientes por el hongo biocontrolador *T. inhamatum*, no debe dejarse de lado el hecho de que esta prueba es sólo subjetiva, debido a que cada microorganismo tiene velocidades de crecimiento muy diferentes, conjuntamente con la capacidad de asimilación de sustrato (Figura 3).

En laboratorio, el crecimiento de todo microorganismo se ve influenciado por parámetros físicos, químicos y biológicos. Dentro de los parámetros físicos se estudió el efecto de la luz sobre los medios de cultivo. Según los resultados obtenidos se estableció que la luz sí cumple un rol fotoinductor sobre *T. inhamatum* no sólo en el desarrollo de metabolitos secundarios, sino también en

el desarrollo de la biomasa, esto debido a que en los experimentos sometidos a los filtros lila y verde se observó un crecimiento acelerado de la biomasa y un cambio de coloración en los medios de cultivo a siete días de realizada la inoculación del controlador (Tabla 1). En cambio, el experimento sometido a oscuridad, presentó un crecimiento lento, actividad inhibitoria mínima y una coloración del medio menos intensa que la del control. Según Pérez⁹, este fenómeno se debe a que, al existir variaciones de luz sobre los medios de cultivo, se iniciaría la liberación de compuestos que causarían la lisis de la pared fúngica (enzimas), aunque en el caso de este estudio, la ausencia de luz establece su importancia en el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios.

La interacción entre actividad antibiótica (metabolitos secundarios) y variables físicas, sin duda es importante en el desarrollo del biocontrol. Cuando se sometió un medio de cultivo a una variable física como la agitación y/o aeración se observó que la capacidad controladora de los metabolitos secundarios aumentaba (Tabla 2). Estos resultados establecen que la oxigenación del medio cultivo, influye en el desarrollo, síntesis y producción de metabolitos secundarios, con capacidad biocontroladora.

En el metabolismo de todo organismo es muy importante la presencia de nitrógeno (proteínas, enzimas, etc), y en los hongos es mayor aun, debido a que algunos de los compuestos químicos con actividad biológica que son sintetizados por estos microorganismos, presentan nitrógeno en su estructura. En tal razón se adicionó nitrato de amonio a los medios de cultivo PDC, ya que este compuesto fue reportado como un factor que incrementaría la actividad biocontroladora de *T. inhamatum*¹⁰. Respecto al análisis de varianza, los resultados no reportaron significancia alguna, ni cuando se añadió nitrato de amonio al medio de cultivo, ni cuando éstos fueron sometidos a diferentes filtros de luz, mas al contrario, existió una inhibición en la producción de metabolitos secundarios activos, como se observa en la Tabla 3. Las fuentes de carbono o nitrógeno pueden limitar la síntesis de enzimas y disminuir la degradación de los compuestos nutricionales que se encuentran en el medio de cultivo. Sánchez¹¹, estudió la regulación de nitrógeno en la formación de penicilina G por *Penicillium chrysogenum*, y reportó que existe una interrupción de la síntesis de penicilina, cuando existían concentraciones mayores a 85 mM de nitrógeno.

Los resultados obtenidos expresan que la temperatura y el pH, influyen en la actividad metabólica de *T. inhamatum*. Ésto se observó cuando se empleó como fuente de carbono el filtrado de papa y su cáscara (Tabla 4). En cuanto al empleo de aserrín como fuente de carbono se obtuvieron resultados negativos sobre el control de *B. fabae*, este factor se debe a que no todos

los sustratos pueden ser asimilados por los mecanismos enzimáticos para metabolizarse, y mas aun, algunas de estas fuentes de carbono pueden inhibir la ruta metabólica de algunos metabolitos secundarios¹². La temperatura es otro factor importante en el desarrollo de los hongos, ella está involucrada directamente con el crecimiento. Ésto se observó en las experiencias realizadas, cuando se empleó cáscara de papa y glucosa como fuente de carbono: a una temperatura de 4 °C, el crecimiento hifal se inició a los 14 días. En cuanto a la temperatura de 37 °C, se observó un efecto similar, se vio crecimiento sobre el medio de cultivo el día décimo; en cambio a 22 °C, las características de crecimiento del hongo fueron claramente distinguibles, en las fuentes de carbono de filtrado de papa y cáscara de papa se observó un crecimiento acelerado en especial en los pH 4 y 5. En contraste con el aserrín, a pesar de que a esta temperatura sí hubo crecimiento, sólo se observó una delgada capa de hifas incoloras. Éste fenómeno también se observó tardíamente, cuando se empleo aserrín como fuente de carbono a temperaturas de 4°C y 37 °C.

El co – cultivo o elicitado de medio, es una prueba en la que se pretende mejorar las características controladoras del hongo controlador (*T. inhamatum* BOL 12 – QD), al someter al hongo controlador frente al organismo patógeno (*B. fabae*). Esta prueba es similar a los enfrentamientos duales, sólo que se realiza en medio líquido y primeramente se inocula al controlador y posteriormente, pasado 5 días, al patógeno. Dentro los resultados obtenidos, se pudo observar que las concentraciones de esporas de *B. fabae* y de *T. inhamatum*, influyeron en la producción de metabolitos secundarios (Tabla 5).

La atenuación o elicitado, es un proceso por el cual se pretendió estimular aún más la actividad controladora de *T. inhamatum*, aunque la mejor actividad reportada sólo alcanzó al 51 % (Tabla 5). Este resultado se aproxima bastante a los obtenidos cuando se emplearon filtros de luz sobre los fermentos. Según Harman¹³ *Trichoderma* tiene la capacidad de detección de agentes patógenos (proteínas características), de manera que al detectarse tales proteínas se iniciaría un proceso de defensa, mediante metabolitos secundarios y enzimas hidrolíticas. Las concentraciones extremas en esta prueba presentaron los resultados más significativos (Tabla 5, Figura 6).

La realización de la técnica de co – cultivo por biomasa, se basó en el fundamento de inmunización, para lo cual, se empleó biomasa atenuada de *B. fabae*, con la finalidad de inducir una respuesta por parte *T. inhamatum*. Se encontró que existen tres concentraciones a las cuales la actividad de inhibición es mayor al 50 % (Tabla 6, Figura 7). Al existir estructuras proteicas que cumplen un papel en la activación de ciertos genes de *Trichoderma*, involucrados en la formación de metabolitos secundarios, es evidente que

las macro estructuras de patógeno *B. fabae*, cumplen un rol muy importante en la inducción para la producción de metabolitos secundarios.

El análisis de la actividad controladora de *T. inhamatum* en plántulas de haba, es una prueba con la que se pretendió establecer la capacidad biocontroladora de este hongo in vivo, comparando su actividad con diferentes tratamientos (Biosulfocal, Tricobio y esporas de *Trichoderma*) y ecotipos de haba (Gigante Copacabana e Isla del Sol). En lo concerniente a los resultados de: peso de plántula, longitud de vaina, número de vaina, peso de vaina, número de grano verde, peso de grano verde y peso de grano seco, está claro el predominio de la actividad del fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD. Está claro que el fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD, produce un efecto no sólo de biocontrol por parte de los metabolitos activos, sino que también las moléculas presentes en este medio participan como mediadoras en la activación de factores relacionados con la respuesta inmune de la plántula y media ciertos factores de crecimiento^{13,14,15}, como se observa por los resultados obtenidos. Otros resultados encontrados, establecen que la aplicación de esporas de *Trichoderma*, sobre las plántulas de haba, es un tratamiento eficaz en el control de la Mancha Chocolate, sin embargo, no debe dejarse de lado que estos son microorganismos ajenos al ecosistema del altiplano. Respecto a la actividad de *T. inhamatum* BOL – 12 QD, sobre el porcentaje de severidad, este tratamiento se encuentra como segunda mejor alternativa, pero a diferencia del tratamiento con esporas de *Trichoderma*, éste es más seguro, ya que lo que se aplica sobre las plántulas no es materia viva sino el producto originado por el metabolismo secundario del hongo (fermento) a partir de materia orgánica, producido por *T. inhamatum*. Este resultado cobra aún más relevancia, ya que el fermento de *T. inhamatum* BOL 12 QD, no es un producto de expendio en el mercado, y éste ejerce un control similar, a los productos empleados en el tratamiento de plagas.

En el análisis del rendimiento de la totalidad de la parcela de estudio, se puede observar la existencia de significancia en los resultados ($p \leq 0.05$), respecto a los ecotipos y tratamientos. Una de las observaciones más sobresalientes de estos resultados, es que en el análisis de unidades experimentales de haba respecto al peso, el tratamiento con Tricobio en el ecotipo Isla del Sol presentó el mejor rendimiento por unidad experimental con 90.82 g/plántula de haba (Tabla 7), y respecto al ecotipo Gigante de Copacabana estaba como tercer mejor tratamiento con 84.92 g/plántula de haba (Tabla 7). Pero al realizar el análisis del peso de la totalidad de la parcela de estudio, éste es desplazado por el tratamiento con Biosulfocal, debido a que los tratamientos con *T. inhamatum* BOL 12 QD y Biosulfocal, presentan los mejores rendimientos de peso

en grano seco en ambos ecotipos con 3,333 Kg/Ha (Gigante Copacabana) y 2,533 Kg/Ha (Isla del Sol) (Tabla 8, Figura 8).

El haba es un producto que puede ser usado tanto en grano verde como seco. Si bien en los mercados este producto se expende mayormente como grano verde (en vaina), poco a poco va cobrando importancia el expendio de grano seco, gracias a iniciativas de pequeños empresarios, quienes permiten que este producto vaya adoptando nuevas formas de expendio tal es el caso de la harina, sopa, pito y pan de haba, que poco a poco van insertándose en los supermercados como alternativas de consumo. En tal caso, los resultados obtenidos aportarían de manera sustancial, en la mejora de la producción del grano seco de haba, como en el cuidado del medio ambiente. Algo muy importante a destacar, es que los productos ecológicos tienen un precio superior al de los productos convencionales, que varían en relación directa con la oferta disponible, por lo que fomentar la producción, consumo y exportación de estos productos es una excelente alternativa para desarrollar y aprovechar más los mercados internacionales.

AGRADECIMIENTOS

A la cooperación UMSA – ASDI-SAREC, IFS, IDH por el financiamiento del proyecto; al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por la acogida para la realización del presente estudio; a los hermanos de la asociación “Flor de haba” de la comunidad Chua Cocani.

REFERENCIAS

1. Boletín Técnico UMSA - JICA. Enfermedades foliares de la haba (*Vicia faba* L) en el Altiplano de La Paz y su manejo. 2004; 3.
2. Calviello G. Piccioni E. Boninsegna A. Tedesco B. Maggiano N. Serini S. Wolf F. Palozza P. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism: *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 211, 87-96.
3. Harman E, Howell R, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts: *Nature Review Microbiology*. 2004; 2: 43 – 56.
4. Howell R. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts: *Plant Disease*. 2003; 87: 4 – 10.
5. Sivasithamparam K. Ghisalberti L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P., *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 139–191.
6. Ciancas J. Terrazas E. Alvarez T. Gimenez A. Efecto biocontrolador de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD sobre el filopatógeno *Botrytis cinerea* causante de

Con formato: Numeración y viñetas

la "Mancha chocolate" en cultivos de haba de la comunidad de Chirapaca. [Tesis de Maestría]. La Paz: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés; 2006.

7. Aleu J. González I. Biotransformation by *Botrytis* species: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2001; 13, 77–93.
8. Sahilela S. Fininsaa C. Sakhujaa P. Ahmedb S. Effect of mixed cropping and fungicides on chocolate spot (*Botrytis fabae*) of faba bean (*Vicia faba*) in Ethiopia: *Crop Protection.* 2008; 27, 275–282.
9. Perez S. Determinación del la función del dominio LOV de la proteína BLR-1 de *Trichoderma atroviride*. [Tesis de Maestría], Potosi: Laboratorio de Biología Molecular, división de Biología Molecular, Instituto Potosino de investigación Científica y Tecnológica; 2007.
10. Apaza L. Terrazas E. Alvarez T. Gimenez, A. Optimización de parámetros físicos, químicos y biológicos del cultivo de *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD para una mejor producción de compuestos biológicamente activos contra *Botrytis cinérea*. [Tesis de Maestría]. La Paz: Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés; 2008.
11. Sánchez L. Paniagua C. Mateos F. Mora. E. Nitrogen regulation of penicillin G biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Adv. Biotechnol.* 1981; 3, 147-154.
12. Martin J F, Aharonowitz Y. Regulation of biosynthesis of β -lactam antibiotics. In: Demain A L, Solomon N A, editors. Antibiotics containing the β -lactam structure. I. Berlin, Germany: Springer-Verlag, KG; 1983. pp. 229–254.
13. Harman .E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp*: *Phytopathol.* 2006; 96, 190–194.
14. Yedidia I. Shores M. Kerem Z. Benhamou N. Kapulnik Y. Chet I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae*, lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins: *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69, 7343–7353.
15. Hanson E. Howell R. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*: *Phytopathol.* 2004; 94, 171–176.

← - - - Con formato: Numeración y viñetas

← - - - Con formato: Numeración y viñetas