

Efectos de *Trichoderma asperellum* en la estimulación del crecimiento en chile dulce (*Capsicum annum*) variedad Nathalie en ambientes protegidos

Effects of *Trichoderma asperellum* on growth stimulation in sweet pepper (*Capsicum annum*) variety Nathalie in greenhouse

Jaime Brenes-Madriz¹, Claudia Zúñiga-Vega²,
Marvin Villalobos-Araya³, Cristian Zúñiga-Poveda⁴,
William Rivera-Méndez⁵

Fecha de recepción: 8 de agosto de 2018
Fecha de aceptación: 23 de octubre de 2018

Brenes-Madriz, J; Zúñiga-Vega, C; Villalobos-Araya, M; Zúñiga-Poveda, C; Rivera-Méndez, W. Efectos de *Trichoderma asperellum* en la estimulación del crecimiento en chile dulce (*Capsicum annum*) variedad Nathalie en ambientes protegidos. *Tecnología en Marcha*. Vol. 32-3. Julio-Setiembre 2019. Pág. 79-86.

DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v32i3.4481>

- 1 Ing. Agrónomo, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Costa Rica. Correo electrónico: jabrenes@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0003-2325-8808>
- 2 Bióloga, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Costa Rica. Correo electrónico: czuniga@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0001-7267-6788>
- 3 Ing. Agrícola, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Ingeniería Agrícola. Costa Rica. Correo electrónico: mvillalobos@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-1321-9971>
- 4 Ing. Agrónomo, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Ingeniería Agrícola. Costa Rica. Correo electrónico: cristian.zuniga@ctasoluciones.com.
- 5 Ing. Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@tec.ac.cr.  <https://orcid.org/0000-0002-2065-6264>



Palabras clave

Trichoderma asperellum; metabolitos secundarios; bio-filtrado; *Capsicum annum*; ambientes protegidos.

Resumen

La utilización de especies del hongo *Trichoderma* es de uso frecuente en el control biológico, donde inicialmente se aplicó por sus propiedades micoparásitas y antibióticas. Numerosas publicaciones han demostrado también su capacidad para colonizar las raíces y sus múltiples efectos favorables sobre los cultivos. Para Costa Rica no hay referencias que hagan mención al uso de filtrado de metabolitos secundarios para incrementar la producción de chile dulce. El objetivo de esta investigación consistió en comparar el efecto de filtrado de metabolitos secundarios presentes en un biofiltrado del hongo *Trichoderma asperellum* en la estimulación del crecimiento en chile dulce (*Capsicum annum* var Nathalie) en ambientes protegidos. Se evaluaron tratamientos a diferentes concentraciones de *T. asperellum* y de sus biofiltrados, en almácigos de esta hortaliza. Los efectos obtenidos con la aplicación de *T. asperellum* sobre la estimulación del crecimiento indican que la utilización de este biocontrolador tiene un impacto mayor en la etapa de almácigo. El tratamiento de T50 (*T. asperellum* al 50%) resultó ser la mejor opción durante los dos años de análisis en la elongación de la raíz, además promovió un incremento en la biomasa de la raíz y el área foliar. Sin embargo, la utilización de este microorganismo en invernadero en la etapa de productividad, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, aunque se observó un buen desarrollo foliar de las plantas comparadas con el testigo.

Keywords

Trichoderma asperellum; secondary metabolites; cultured filtrate; *Capsicum annum*; protected environments.

Abstract

The use of *Trichoderma* fungus species is frequently used in biological control, where it was initially applied for its mycoparasitic and antibiotic properties. Numerous publications have also demonstrated its capacity to colonize the roots and their multiple favorable effects on crops. For Costa Rica there are no references that mention the use of secondary metabolites to increase production in sweet peppers. The objective of this research was to compare the effect of secondary metabolites present in a *Trichoderma asperellum*'s cultured filtrated in the stimulation of growth in sweet pepper (*Capsicum annum* var Nathalie) in protected environments. Treatments were evaluated at different concentrations of *T. asperellum* and its biofiltrates, in sweet pepper seedlings of the variety. The effects obtained with the application of *T. asperellum* on the stimulation of growth indicate that the use of this biocontroller has a major impact on the nursery stage. The treatment of T50 (*T. asperellum* 50%) was the best option during the two years of analysis in the elongation of the root, promoted an increase in the biomass of the root, besides it promoted an increase in the biomass of the root and the foliar area. However, the use of this microorganism in the greenhouse in the stage of productivity did not show significant differences between treatments, although a good foliar development of the plants compared with the control was observed.

Introducción

En Costa Rica, se ha incrementado el cultivo en ambientes protegidas. El 89% de los invernaderos está destinado a la producción de hortalizas, con un 11% dedicado al chile dulce. Esta forma de cultivar favorece la protección contra los factores climáticos, como los ocasionados por el cambio climático global y permite un manejo integrado de plagas y enfermedades, por lo que permite intensificar la producción. Por otra parte, el uso de tecnologías de sistemas de riego localizados, como el goteo, promueve una mejor eficiencia en el uso del agua y fertilizantes. Asimismo, en invernaderos se pueden aplicar técnicas que permiten una mayor producción por área comparada con el campo abierto, también los ciclos del cultivo se pueden extender, porque la planta no se encuentra sometida a cambios bruscos de temperatura, precipitación y exposición a fitopatógenos, lo que contribuye a mantener constante la calidad y la oferta [1,2].

La distancia de siembra juega un papel importante ya que es la que determina el mejor aprovechamiento del espacio dentro del invernadero; a campo abierto, el chile dulce se puede mantener a una distancia de 0.70m-1.20m entre hileras y entre plantas entre 0.40m a 0.60m con una producción de 8000 kg hasta 42000 kg/ha; mientras que en invernadero la producción podría aumentar con una distancia de 0.20m -1.20m entre hileras y a 0.20m entre plantas en un rango de 30000 kg hasta 150 000 kg/ha [3]. Ramírez y Nienhuis [4] mencionan, que la producción de chile dulce en Costa Rica a campo abierto es en promedio de 20 frutos por planta, mientras que bajo invernadero puede alcanzar los 50 frutos por planta.

En Costa Rica, el uso de *Trichoderma* se ha generalizado, principalmente por su capacidad como antagonista de hongos [5, 6, 7, 8]. Este hongo se localiza en todas las zonas climáticas del mundo, incluyendo la tundra, la Antártida y los trópicos. Numerosas publicaciones han demostrado también su gran capacidad para colonizar las raíces y los múltiples efectos favorables que ejerce sobre los cultivos [9,10].

El género *Trichoderma* comprende muchas especies que producen una gran variedad de filtrado de metabolitos secundarios. Ya que es útil como biocontrolador no solo de hongos, sino también de bacterias y de virus. Estos metabolitos no son esenciales para la sobrevivencia del microorganismo, por lo que se denominan secundarios y cumplen diversas funciones. En la actualidad se está promoviendo su uso, ya que son más fáciles de manejar que los organismos completos, se necesitan menores cantidades para lograr el efecto deseado, presentan una vida útil más larga y además logran un efecto más directo y un estímulo mayor sobre el cultivo a tratar, por ser más específicos [11].

En algunas especies de este género, se han descubierto mecanismos moleculares que promueven una simbiosis con las plantas [12], lo cual incide en el crecimiento vegetal, la absorción de los nutrientes y la inducción de resistencia sistémica o localizada en las mismas, como consecuencia en parte de la colonización por el biocontrolador de la rizosfera y del sistema radicular, lo que trae como consecuencia un incremento en la productividad. Asimismo, se ha encontrado que proveen tolerancia al estrés abiótico (calor, frío, sal), solubilizan los nutrientes y hasta pueden actuar en procesos de biorremediación para degradar metales pesados y otros contaminantes ambientales [13].

Como el chile dulce es una hortaliza con un consumo per cápita anual de 1.6 kg, donde se destinaron 1085 ha a la siembra de este cultivo y cuya producción bajo invernaderos se ha incrementado considerablemente en los últimos años [3,14], se consideró importante, hacer una evaluación preliminar para comparar el efecto de filtrado de metabolitos secundarios presentes en un biofiltrado del hongo *Trichoderma asperellum* en la estimulación del crecimiento en chile dulce (*Capsicum annum* var Nathalie) en ambientes protegidos, con miras a disminuir los costos relacionados con el uso de agroquímicos.

Materiales y métodos

Etapa de almácigo

Se establecieron almácigos de chile dulce, variedad Nathalie, en la empresa Villa Plant, los cuales fueron inoculados con *T. asperellum*. Las semillas se plantaron en bandejas plásticas con capacidad para 288 plantas; se llenaron con una mezcla de sustrato compuesto de 1/3 abono orgánico, 2/3 suelo y un complemento de granza de arroz a razón de 100 g/k de mezcla, desinfectado previamente con vapor a 80°C. El llenado de las bandejas con sustrato se realizó de forma manual y la siembra de las semillas por medio de una sembradora mecánica. Posteriormente, se cubrió con una capa de sustrato y se le aplicó cada uno de los tratamientos. Las bandejas cultivadas se colocaron en cámaras de germinación a una temperatura de 23 °C y una humedad relativa del 96%, para asegurar una buena geminación; la inoculación y rotulación del almácigo se realizó al día siguiente de sembradas las semillas.

Los tratamientos evaluados fueron:

1. Testigo absoluto, en el cual no se utilizó aditivo para la protección radicular
2. *T. asperellum* al 50% (55 g de un preparado de *T. asperellum* por 3.6 L de agua cultivado en arroz).
3. *T. asperellum* al 100% (110 g de un preparado de *T. asperellum* por 3.6 L de agua, cultivado en arroz).
4. Tratamiento con agroquímicos a base de Vitavax® al 100% (dosis de 8.5 g del producto disuelto en 3.6 L de agua).

Las aplicaciones de los diferentes tratamientos se realizaron cada 10 días. Las plántulas se trasladaron al invernadero a los 15 días, donde se continuó con las aplicaciones de los distintos tratamientos. Se hicieron mediciones de peso seco de las raíces y el área foliar, así como de la longitud de la raíz, para el análisis de almácigos. El experimento se repitió durante el siguiente año y se añadieron dos tratamientos más que fueron: la aplicación de un biofiltrado de metabolitos de *T. asperellum* al 100% fue el quinto tratamiento y la aplicación de un biofiltrado de metabolitos de *T. asperellum* al 50% el sexto. Se hicieron mediciones del peso seco del área foliar, la longitud de la raíz y el peso seco de la raíz.

Etapa de invernadero

Para la etapa de campo, las plántulas de chile se sembraron en un invernadero, perteneciente a la Escuela de Ingeniería Agrícola del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC). Se evaluaron seis filas con 30 plantas cada una, las cuales se marcaron con cintas de colores y a cada fila se le aplicó un tratamiento. Para la preparación de filtrado de metabolitos secundarios al 100% se utilizaron 4.5ml del biofiltrado, que se mezcló en un beaker con 900ml de agua y se aforó. Para la solución al 50% se utilizó 2.25ml del preparado anterior, los cuales se obtuvieron agregando estos a un beaker con 900ml de agua y se aforó a un litro. Las aplicaciones de cada tratamiento se realizaron cada 10 días, hasta concluir con el período correspondiente, según el desarrollo del cultivo.

El detalle de los tratamientos evaluados, en un diseño de bloques completos al azar fue:

1. *T. asperellum* al 100% (110 g de un preparado de *T. asperellum* por 3.6 L de agua, cultivado en arroz).
2. *T. asperellum* al 50% (55 g de un preparado de *T. asperellum* por 3.6 L de agua cultivado en arroz).

3. Tratamiento con agroquímicos a base de Vitavax® como protector radicular en una dosis de 8.5g del producto disuelto en 3.6 L de agua.
4. Aplicación de un biofiltrado de metabolitos de *T. asperellum* al 100%.
5. Aplicación de un biofiltrado de metabolitos de *T. asperellum* al 50%.
6. Testigo absoluto, en el cual no se utilizó ningún aditivo para la protección radicular.

Se hicieron mediciones de la cantidad de frutos producidos por tratamiento durante dos meses, y se evaluó la calidad del producto en primera, segunda y tercera, además se determinó el peso de lo producido en cada tratamiento.

Resultados y discusión

Etapa de almácigo

En el cuadro 1 se presentan los resultados obtenidos en cada uno de los tratamientos y las variables analizadas. Con el tratamiento T50 se logró el mayor peso aéreo seco. Para las variables de longitud de la raíz y peso seco de la raíz, T50 y T100 fueron los tratamientos que presentaron el mejor comportamiento. De lo anterior, se podría recomendar el uso de T50, porque produce mayores ventajas, tanto a nivel de raíz, como de parte aérea y es más económico. El tratamiento con agroquímicos no se debe recomendar, porque el crecimiento que promueve no es correspondido por un incremento en la biomasa de la planta. Para el segundo año, los tratamientos con *Trichoderma* al 100% y 50%, junto con el Testigo y el biofiltrado al 50% tuvieron el mismo impacto sobre la elongación de la raíz. Sin embargo, si se considera el peso seco, el mayor aumento en la biomasa de la raíz se logró con *Trichoderma* al 50%.

T50 también fue el mejor tratamiento en lo que se refiere al peso seco. De lo anterior, se podría recomendar la utilización de T50, por ser más económico que T100 y más fácil de preparar que B50 (Cuadro 1). Mientras que el tratamiento con agroquímicos no aparece en ninguno de los mejores tratamientos obtenidos, por lo que es importante reconsiderar su utilización, tomando en cuenta el parámetro de costo/beneficio.

Cuadro 1. Comparación entre las variables analizadas y los tratamientos aplicados. Año 1 y 2

Variable	Año 1 Mejor tratamiento y media	P*	Año 2 Mejor tratamiento y media	P*
Peso seco área foliar	T50 311.400 Test 280.700	Kruskall Wallis P= 1.916e-05	B50 163.3333 T50 143.0667	Kruskall P= 6.289e-13
Longitud raíz	T50 118.53675 T100 112.27625	Kruskall Wallis p= 0.0002111	Test 4.706443 B50 4.691537	ANOVA P=0.000125
Peso seco raíz	T50 171.300 T100 162.925	Kruskall Wallis P= 0.0002111	T50 69.93333 B50 64.0666	Kruskall P=1.436e-07

*P: prueba de significancia. Se aplicó Kruskall wallis o ANOVA según la Normalidad y Homocedasticidad de la muestra

Etapa de invernadero

En el cuadro 2 se observa la producción obtenida durante ocho semanas de chile dulce por tratamiento, según calidad y cantidad. En el cuadro 3, se presenta el peso total en kg de los chiles dulces cosechados por tratamiento.

Cuadro 2. Producción de chile dulce por tratamiento, según calidad y cantidad.

Tratamientos																	
1			2			3			4			5			6		
1a	2a	3a	1a	2a	3a	1a	2a	3a	1a	2a	3a	1a	2a	3a	1a	2a	3a
103	29	21	101	35	22	75	44	21	90	33	26	102	45	17	90	30	29
Total 153			Total 158			Total 140			Total 149			Total 164			Total 149		

Cuadro 3. Peso total (kg) de los chiles cosechados por tratamiento

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	20,55	21,38	18,00	18,63	21,61	19,63

El análisis estadístico realizado sobre los datos de rendimiento en invernadero no mostró diferencias significativas para ningún tratamiento con respecto al control ($p > 0,05$). Lo mismo ocurrió para las variables de primera, segunda y tercera calidad. En la figura 1 se detalla el comportamiento obtenido en el rendimiento de los chiles dulces, durante 8 semanas por tratamiento. Y en la figura 2 el rendimiento de chiles dulces en kg según tratamiento aplicado y calidad del fruto.

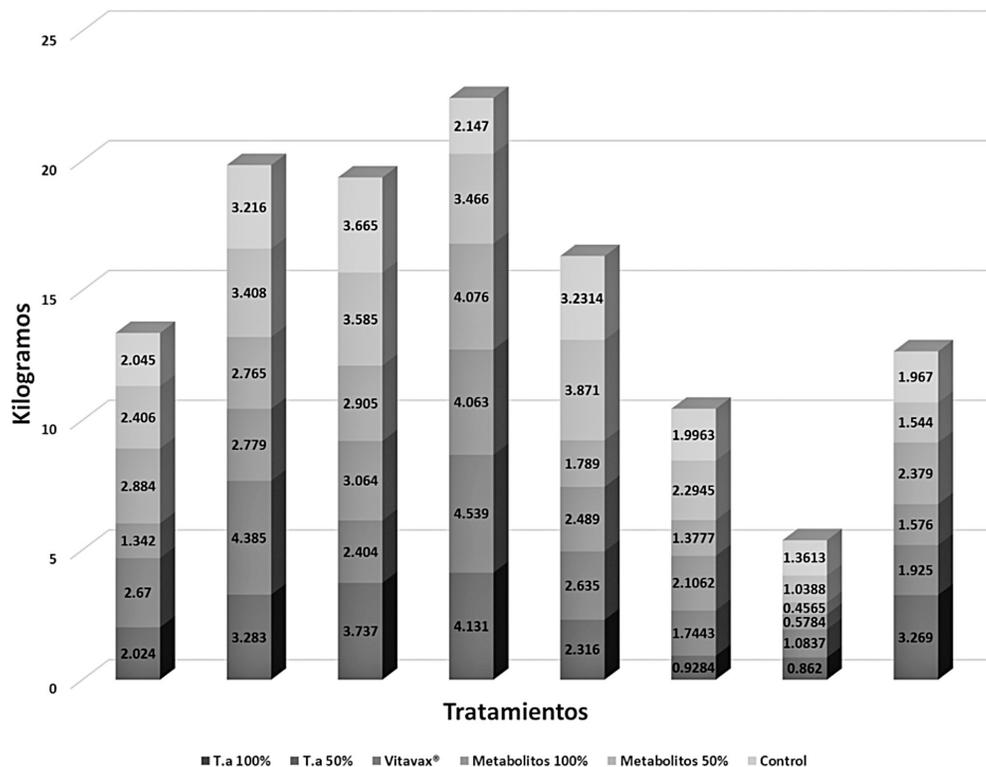


Figura 1. Rendimiento en kilogramos de chile dulce en ocho fechas de muestreo según tratamiento.

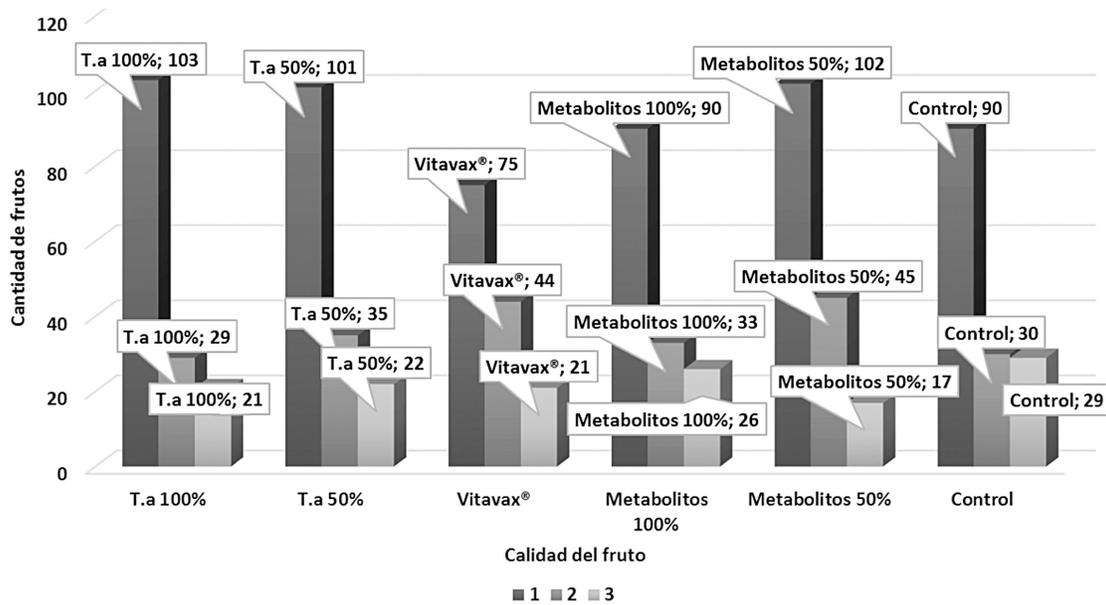


Figura 2. Rendimiento de chiles dulces en kg según tratamiento aplicado y calidad del fruto

Conclusiones

Los efectos obtenidos con la aplicación de *T. asperellum* sobre la estimulación del crecimiento en chile dulce (*Capsicum annum*) variedad Nathalie en ambientes protegidos indican que la utilización de este biocontrolador tiene un impacto mayor en la etapa de almácigo. El tratamiento de T50 resultó ser la mejor opción durante los dos años de análisis en la elongación de la raíz, además promovió un incremento en la biomasa de la raíz y el área foliar. Sin embargo, la utilización de este microorganismo en la etapa de invernadero en la productividad, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, aunque se observó un buen desarrollo foliar de las plantas comparadas con el testigo.

Agradecimientos

Este proyecto contó con el financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Referencias

- [1] C. Méndez and F. Marín, "El concepto de agricultura protegida para el Trópico latinoamericano". *Boletín ProNAP* vol. 9, pp. 2-12, 2015.
- [2] J. Monge, "Evaluación de 60 genotipos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivados bajo invernadero en Costa Rica". *Intersedes*, vol. 16, pp. 88-122, 2015.
- [3] M. Carrillo *et al.*, "Agrocadena regional cultivo chile dulce" *Ministerio de Agricultura y Ganadería. Alajuela, Costa Rica*. Disponible: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00069.pdf>, 2007.
- [4] C. Ramírez and J. Nienhuis, "Cultivo protegido de hortalizas en Costa Rica". *Tecnología en Marcha*, vol. 25, pp.10-20, 2012.
- [5] L. Alvarado-Marchena and W. Rivera-Méndez, "Molecular Identification of *Trichoderma* spp. in garlic and onion fields and *in vitro* antagonism trials on *Sclerotium cepivorum*". *Rev Bras Cienc Solo*, vol 40:e0150454, 2016.



- [6] K. Astorga-Quirós *et al.*, “Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo”. *Tecnología en Marcha*, vol. 27, pp. 82-91, 2014.
- [7] W. Bettiol *et al.* (Eds.), “Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe”. ISBN: 978-9974-0-1091-8, 2014.
- [8] J. Brenes *et al.*, “Cultivo del ajo en Costa Rica”. *EUNED*. ISBN 978-9968-31-958-4, 100p, 2013.
- [9] G. E. Harman, “Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp”. *Phytopathology*, vol. 96, pp. 190-194, 2006.
- [10] I. Samolski *et al.*, “The qid74 gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant bio-fertilization”. *Microbiology*, vol. 158, pp.129–138, 2012.
- [11] Keswani *et al.*, “Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp”. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 98, pp. 533-544, 2014.
- [12] M. Lorito *et al.*, “Translational Research on *Trichoderma*: From Omics to the Field”. *Annu Rev Phytopathol*, vol. 48, pp. 395–417, 2010.
- [13] P.K. Mukherjee *et al.*, “*Trichoderma* Research in the Genome Era”. *Annu. Rev. Phytopathol.* vol. 51, pp. 105–129, 2013.
- [14] Costa Rica, “VI Censo Nacional Agropecuario 2014, Resultados Generales”. *Instituto Nacional de Estadística y Censos*, p. 76, 2015.