

## Biocontrol de Damping off y promoción del crecimiento vegetativo en plantas de *Capsicum chinense* (Jacq) con *Trichoderma* spp.

Edgar Javier Larios Larios  
José de Jesús Wilmer Valdovinos Nava  
Wilberth Chan Cupul<sup>§</sup>  
Felipe Alejandro García López  
Gilberto Manzo Sánchez  
Marco Tulio Buenrostro Nava

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias-Universidad de Colima. Autopista Colima-Manzanillo km 40, Tecomán, Colima. CP. 28934. (elarios5@uclm.mx; wilmer\_vnava@hotmail.com; fgarcia@uclm.mx; gmanzo@uclm.mx; mbuenrostro0@uclm.mx).

<sup>§</sup>Autor para correspondencia: wchan@uclm.mx

### Resumen

El objetivo del estudio fue determinar la efectividad de *Trichoderma* spp. en la reducción de la incidencia del Damping off y promoción del crecimiento vegetativo de plantas de *Capsicum chinense* (Jacq.) var. “Chichen Itza”. Se evaluó la aplicación foliar, a través de un diseño completo al azar, de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. (SP6 y Clombta), la co-aplicación de ambas, un producto comercial (Tri-HB<sup>®</sup>: *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*) y un fungicida químico (Captan<sup>®</sup>). Durante el periodo de estudio, las plantas tratadas con *Trichoderma* sp. Clombta y con la co-inoculación de *Trichoderma* sp. Clombta + *Trichoderma* sp. SP6 no mostraron síntomas de Damping off. Por el contrario, plantas tratadas con Captan<sup>®</sup> y Tri-HB<sup>®</sup> mostraron los porcentajes de incidencia acumulada más alta con 5 y 4.5%, respectivamente. Asimismo, a los 28 días después de la germinación, plantas tratadas con *Trichoderma* sp. Clombta presentaron una mayor altura (11 cm), diámetro de tallo (2.6 mm), biomasa aérea (fresca= 0.8 g planta<sup>-1</sup> y seca= 0.13 g planta<sup>-1</sup>) y volumen radicular (fresca= 0.13 g planta<sup>-1</sup> y seca= 0.04 g planta<sup>-1</sup>), en comparación al resto de los tratamientos evaluados. Para la formación de hojas (9.1 hojas planta<sup>-1</sup>), área foliar (10.2 cm<sup>2</sup>) e índice de clorofila (Clombta= 209.9) la aplicación de *Trichoderma* sp. Clombta destacó de nuevo con los valores más altos ( $p < 0.05$ ), respecto a las aplicaciones de Captan<sup>®</sup> y Tri-HB<sup>®</sup>. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que la cepa de *Trichoderma* sp. Clombta a concentración de  $1 \times 10^{13}$  conidios mL<sup>-1</sup> resultó efectiva para el manejo del Damping off y promoción del crecimiento vegetativo de plantas de *C. chinense* var. “Chichen Itza”.

**Palabras clave:** chile habanero, fungicida biológico, incidencia, índice de clorofila.

Recibido: enero de 2019

Aceptado: marzo de 2019

## Introducción

México sobresale en la producción de chile (*Capsicum* spp.) en el mundo y es el quinto abastecedor del consumo a nivel global, el cual alcanza una producción de 2.3 millones de toneladas. En el país, el chile es el tercer cultivo hortícola más importante considerando la superficie sembrada. En 2018 se establecieron alrededor de 26 300 ha de chile, de la producción cosechada, Sinaloa ocupó el primer lugar (15 625 ha), seguido por Chiapas (2 451 ha), Veracruz (1 952 ha), Sonora (1 814 ha) y Oaxaca (1 364 ha) (SAGARPA, 2018a). Mientras que Colima (269.5 ha) ocupó el veintavo lugar con 9 172 t de producción y un rendimiento de 34.03 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2018).

En cuanto a la producción de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) se estima que México produce 9 072 t anuales; los estados con mayor producción son Tabasco, Yucatán y Campeche con 4 546, 2 615 y 578 t, respectivamente (Ocampo-Thomason, 2014). El estado de Colima produce entre 9 y 28 t anuales, esta baja producción podría deberse a diversas razones; por ejemplo, no existen paquetes tecnológicos adaptados a la zona, no se conoce la respuesta de las variedades comerciales al clima del estado, aún no se promueven los beneficios del consumo del chile habanero en la sociedad consumidora y su uso potencial en la industria (Ocampo-Thomason, 2014; SAGARPA 2018b).

La producción comercial de plantas de chile habanero en invernadero o durante su trasplante se puede ver severamente afectada por hongos y oomycetos fitopatógenos provenientes del suelo, agua y sustratos. Entre ellos se encuentran los géneros *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phytophthora* (Mojica *et al.*, 2009), los cuales son los principales agentes causales del *Damping off*. Esta patología se caracteriza por una pudrición en la base del tallo de la planta al nivel del suelo, lo cual ocasiona la marchitez y muerte de las mismas originando pérdidas importantes (Cárdenas *et al.*, 2005).

El manejo del *Damping off* se realiza a través del control de diversos factores abióticos como la humedad relativa y temperatura, los cuales favorecen el desarrollo de los agentes causales. Además, los productores tienen que recurrir al uso de fungicidas químicos, lo que ha ocasionado resistencia en los fitopatógenos, contaminación ambiental en suelo, agua, frutos y toxicidad en plantas. Estas razones son el motivo para la búsqueda de otros métodos más efectivos y no perjudiciales al ambiente y salud humana (Mojica *et al.*, 2009).

Al respecto, el control biológico ha tomado gran relevancia en los últimos años. Dentro de este método de control una de las alternativas consiste en la aplicación de microorganismos antagonistas de patógenos del suelo, como son el uso de especies fúngicas del género *Trichoderma* (Hernández-Mendoza *et al.*, 2011). Algunos aislamientos y especies de este hongo han demostrado ser antagonistas de *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Fusarium* y *Phytophthora*, por lo que varios productos comerciales lo contienen (Naseby *et al.*, 2000; Ezziyyani *et al.*, 2004; Hoyos-Carbajal *et al.*, 2008; Michel-Aceves *et al.*, 2009).

*Trichoderma* lleva a cabo su antagonismo contra los patógenos de las plantas por degradación y posterior asimilación de su contenido celular. Esta actividad antifúngica involucra la producción de antibióticos, incluyendo compuestos que afectan la integridad de las membranas fúngicas, competencia por nutrientes clave y la producción de enzimas que degradan la pared celular de

los hongos (López y González, 2004). Además de desplazar y controlar hongos y oomicetos fitopatógenos de la raíz a través de micoparasitismo y antibiosis, diferentes especies de *Trichoderma* incrementan el crecimiento radical y el desarrollo de las plantas mediante una serie de mecanismos como la solubilización de nutrientes inorgánicos ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\text{FePO}_4$ ), producción de ácidos orgánicos, siderofóros y fitohormonas (Mukherjee *et al.*, 2012; Chirino-Valle *et al.*, 2016).

En estudios previos, Candelero *et al.* (2015) reportaron un incremento en la altura plantas de *C. chinense* por efecto de la inoculación de *Trichoderma* sp. Th05-02 (55.57%) y *Trichoderma virens* (47.62%). Mientras *Trichoderma harzianum* incrementó la longitud (41.57%) y volumen radical (550%) respecto al control (sin inoculación). Asimismo, los autores reportaron la habilidad de algunas cepas para controlar juveniles (J2) del nematodo *Meloidogyne incognita*, las cepas con mayor control (inmovilidad) fueron *T. vires* Th43-13 y *Trichoderma* sp. Th43-14, ambas con 100% de inmovilidad. La bioprospección y evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal y biofungicidas es de suma importancia en la agricultura biológica (Chirino-Valle *et al.*, 2016).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la efectividad de *Trichoderma* spp. en la reducción de la incidencia del Damping off y promoción del crecimiento vegetativo de plantas de *C. chinense* var. “Chichen Itza”.

## Materiales y métodos

La investigación se realizó en el Laboratorio de Control Biológico de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Colima (FCBA-UCOL). Mientras que la experimentación con plantas de chile habanero se realizó en invernadero ubicado en el área de posgrado de la misma Facultad, situado en el km 40 de la autopista Colima-Manzanillo en el municipio de Tecomán, Colima. El clima predominante de la región es cálido subhúmedo ( $\text{AW}_1$ ), con lluvias en verano, temperatura media anual de 26.3 °C, y su localización está entre las coordenadas 18°57'13.4" latitud norte, 103°53'42.6" longitud oeste a una altura de 56 msnm (Cigales y Pérez, 2011).

### Cepas de *Trichoderma*

Se utilizaron dos cepas de *Trichoderma* spp. previamente aisladas por Sánchez-Rangel *et al.* (2016): *Trichoderma* sp. SP6 nativo de la rizosfera de papaya (*Carica papaya* L.), aislada de un cultivo en el rancho “Las Mercedes” (km 9, carretera Tecomán-El Real, Tecomán, Colima., 18°50'26.05" latitud norte y 103°55'13.79" longitud oeste) y *Trichoderma* sp. Clombta nativo de la rizosfera del cultivo de melón (*Cucumis melo* L.) aislado en el municipio de Armería, Colima (19°06'04.91" latitud norte y 104°00'3.74" longitud oeste).

### Producción masiva de esporas de *Trichoderma* spp.

La producción se llevó a cabo en grano entero de arroz (*Oryza sativa* L.) en bolsas de plástico de poliuretano. El arroz se lavó con agua potable y se remojó en 500 ppm de cloranfenicol (Lab. Sophia S. A. de C. V.), durante 30 min. Pasado ese tiempo se colocaron 250 g de arroz en bolsas

de plástico y se esterilizaron en autoclave a 120 °C, durante 45 min a 18 libras de presión. Las bolsas se inocularon con 10 mL de una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . Las bolsas de arroz inoculadas se incubaron a 25 °C con 12 h luz: oscuridad durante 21 días. Posteriormente, los conidios se cosecharon a través del procedimiento descrito por Lezama-Gutiérrez *et al.* (2006).

Los conidios se recuperaron en 250 mL de agua con 0.1 % de Tween 80® (Sigma-Aldrich, Toluca, México). Para separar el grano de arroz de los conidios se pasaron por un tamiz de 200 mallas y un cedazo. La suspensión de conidios obtenida se centrifugó a 3 600 rpm, durante 15 min, con el fin de concentrar los conidios y separarlos del líquido. Una vez obtenidos los conidios, se dejaron secar por dos días en una cámara de flujo laminar a 25 °C, y se almacenaron a 5 °C hasta su utilización en el experimento. Para determinar y ajustar la concentración de los conidios  $\text{mL}^{-1}$  a emplear en los bioensayos, se tomaron 0.1 g del polvo seco (conidios) y se suspendió en 100 mL de agua destilada estéril. A través de una cámara Neubauer® (Marienfeld, Alemania) se contabilizaron y ajustaron las concentraciones de los conidios para los bioensayos (Lezama-Gutiérrez *et al.*, 2006).

### Producción de plantas

Se utilizaron diez charolas de unicel, las cuales se separaron de dos en dos para establecer cinco tratamientos diferentes; cada charola constó de 200 plantas. Se empleó peatmoss BM2 (Martin's®, Shippensburg, PA, USA) como sustrato, a razón de 4 kg charola<sup>-1</sup> con 60% de humedad. Se depositó una semilla de *C. chinense* var. "Chichen Itza" (Seminis®, Ciudad de México) por cavidad a una profundidad de 1 cm. Las charolas se envolvieron en plástico polietileno negro separadas por tratamientos y se dejaron en la oscuridad hasta la germinación durante cinco días.

### Aplicación de los tratamientos

Se emplearon cinco tratamientos, cada uno contempló dos charolas de 200 cavidades, y se midieron 30 plantas por charola. Se consideró una planta como unidad experimental, resultando una n de 60 plantas por tratamiento. Los tratamientos evaluados se describen en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Tratamientos y concentraciones aplicadas en plantas de *Capsicum chinense* var. "Chichen Itza".**

Número	Tratamiento	Dosis	Concentración
1	<i>Trichoderma</i> sp. (SP6)	250 g 200 L <sup>-1</sup>	$1 \times 10^{13}$ conidios $\text{mL}^{-1}$
2	<i>Trichoderma</i> sp. (Clombta)	250 g 200 L <sup>-1</sup>	$1 \times 10^{13}$ conidios $\text{mL}^{-1}$
3	<i>T.</i> SP6 + <i>T.</i> Clombta (Co-inoculación)	250 g 200 L <sup>-1</sup>	$1 \times 10^{13}$ conidios $\text{mL}^{-1}$
4	Tri-HB® ( <i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Bacillus subtilis</i> , Abiosa®, México)	500 g 200 L <sup>-1</sup>	$1 \times 10^{13}$ UFC $\text{mL}^{-1}$
5	Captan (Captan® 50 PH, ADAMA®, México)	400 mL 200 L <sup>-1</sup>	500 ppm

La aplicación de los tratamientos se realizó de forma foliar con la ayuda de una regadera de jardín de 10 L de capacidad, posteriormente se realizó un riego por aspersión con agua potable para bajar el producto a la zona radical. Las aplicaciones se realizaron en horas frescas de la mañana (7:00 - 8:00 am) a los 7, 14, 21 y 28 días después de la emergencia de las plantas.

## Variables de respuesta

Se evaluó la incidencia de la enfermedad como parámetro epidemiológico, además se determinaron las siguientes variables agronómicas: altura, diámetro de plantas, número de hojas, índice de clorofila, biomasa aérea (fresca y seca), biomasa radicular (fresca y seca) y área foliar. Las variables se midieron como se describe a continuación. La incidencia se calculó con la fórmula:  $\text{inc.} = (\text{núm. plantas enfermas} / \text{núm. de total de plantas}) * 100$ . La altura de plantas se midió con una regla (Truper<sup>®</sup>, México) graduada en milímetros, cada siete días después de la germinación. El diámetro de tallo se determinó con un vernier (Truper<sup>®</sup>, México) graduado en milímetros, cada siete días después de la germinación.

El número de hojas se contabilizó de manera manual tomando en cuenta solo las hojas verdaderas y al final del experimento (Aguirre-Medina y Espinosa-Moreno, 2016). El área foliar determinó con la longitud máxima desde la base del pecíolo hasta el extremo del foliolo central y la anchura máxima de las hojas en forma perpendicular a la longitud máxima al final del experimento (Cabezas-Gutiérrez *et al.*, 2009). El índice de clorofila se cuantificó con un espectrofotómetro (FieldScout 1000, Spectrum Technologies, Inc., USA) con sistema de medida de reflectancia de luz a 700 y 840 nm, la unidad de medida fue el índice del contenido relativo de clorofila, con valores que van de 0 a 999 (Mahdavi *et al.*, 2017).

Las mediciones se realizaron cada siete días después de la germinación. La biomasa aérea se determinó mediante el peso fresco y peso seco de la parte vegetativa partiendo de la base del tallo usando una balanza analítica (OHAUS<sup>®</sup>, México). Para la biomasa radicular se tomó en cuenta el peso fresco y peso seco de la parte radical partiendo de la base del tallo tomando en cuenta toda la raíz (Tavera-Zavala *et al.*, 2017). Estas variables fueron evaluadas al final del experimento.

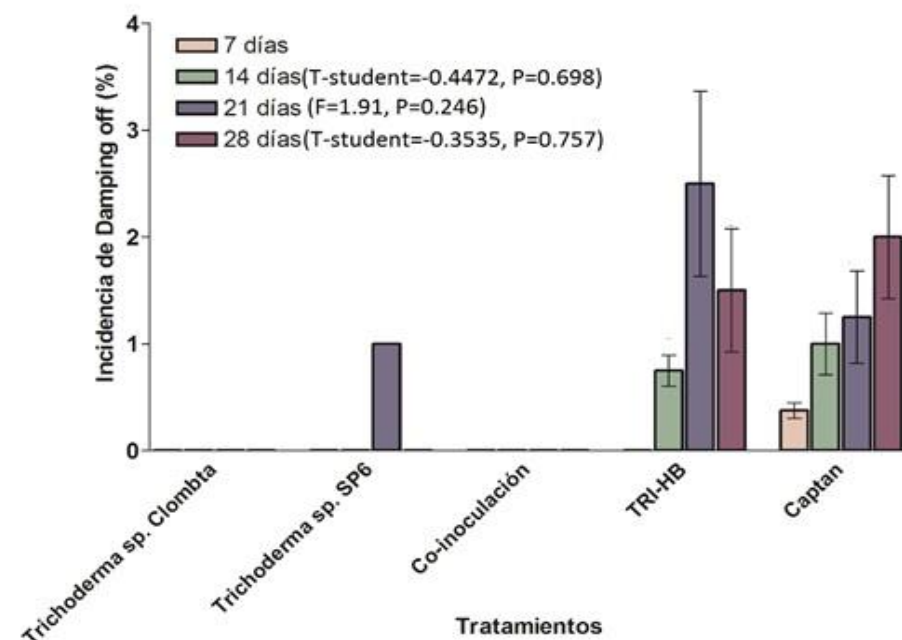
## Diseño experimental y análisis de datos

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y dos réplicas cada uno. Cada réplica consistió en una charola de 200 cavidades. Se midieron 30 plantas por charola como unidad experimental ( $n=60$ ). Únicamente para la variable de incidencia del Damping off se evaluaron 100 plantas por réplica ( $n=200$ ). Las variables evaluadas se analizaron a través de análisis de varianza (ANDEVA), al encontrar diferencia significativa, se realizó una comparación de rango múltiple empleando el estadístico de la diferencia mínima significativa (DMS) con un  $\alpha=0.05$ . Dado a que todos los datos presentaron normalidad de acuerdo al test de Levene ( $p>0.05$ ) no existió la necesidad de emplear transformaciones. Todos los análisis se realizaron con el software StatGraphics Plus<sup>®</sup> y Prism<sup>®</sup>.

## Resultados

### Incidencia de Damping off

A los siete días después de la germinación (aplicación de los tratamientos) no existió diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en cuanto a la incidencia del Damping off entre los tratamientos evaluados, únicamente la aplicación de Captan<sup>®</sup> presentó una planta enferma (Figura 1).



**Figura 1. Incidencia de Damping off en plantas de *Capsicum chinense* var. "Chichen Itza" inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. y con aplicación de Captan® (n=200).**

En la segunda medición (14 días), el ANDEVA reveló que los tratamientos Tri-HB® y Captan® presentaron síntomas de Damping off con dos (1%) y tres plantas enfermas (1.5%), respectivamente. A los 21 días, la incidencia de dicha enfermedad no mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), ya que los tratamientos de *Trichoderma* sp. SP6, Captan® y Tri-HB® presentaron dos (1%), tres (1.5%) y cuatro (2%) plantas enfermas, respectivamente.

Finalmente, en la última medición (28 días) no existió diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), ya que sólo los tratamientos de Captan® y Tri-HB® presentaron cuatro (2%) y tres (1.5%) plantas enfermas cada uno.

Durante todo el período de estudio, en los tratamientos *Trichoderma* sp. Clombta y la co-inoculación de *Trichoderma* sp. Clombta y *Trichoderma* sp. SP6, no registraron plantas con síntomas de Damping off (Figura 1).

### Altura de planta

El ANDEVA indicó que a los siete días después de la germinación (aplicación de los tratamientos) existió diferencia significativa ( $F = 8.65$ ,  $p = 0.00001$ ) en altura de planta por efecto de la aplicación de los tratamientos. La Co-inoculación permitió mayor altura de planta (5.8 cm) en comparación con el resto de los tratamientos, donde los valores oscilaron entre 5.2 a 5.5 cm (Cuadro 2).

En la segunda medición (14 días), el análisis indicó que las plantas tratadas con *Trichoderma* sp. Clombta, *Trichoderma* sp. SP6 y la Co-inoculación tuvieron mayor altura ( $F = 37.1$ ,  $p = 0.00001$ ) con 6.3, 6.3 y 6.4 cm, respectivamente; mientras que los tratamientos con menor altura fueron el Tri-HB® (5.4 cm) y Captan® (5.3 cm, Cuadro 2). En la penúltima (21 días) y última medición (28

días), la aplicación de *Trichoderma* sp. Clombta incrementó significativamente (21 días:  $F= 90.23$ ,  $p= 0.00001$ , 28 días:  $F= 165.91$ ,  $p= 0.00001$ ) la altura de plantas de *C. chinense* en comparación con el resto de los tratamientos, valores promedio de 10 y 11 cm a 21 y 28 días, respectivamente.

**Cuadro 2. Altura de plantas (cm) de *Capsicum chinense* var. “Chichen Itza” inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. y con aplicación de Captan®.**

Tratamiento	Días después de la germinación			
	7	14	21	28
<i>Trichoderma</i> sp. (Clombta)	5.2 ±0.05 c	6.3 ±0.09 a	10 ±0.25 a	11 ±0.21 a
<i>Trichoderma</i> sp. (SP6)	5.5 ±0.08 b	6.3 ±0.07 a	8.3 ±0.06 b	9.8 ±0.09 b
<i>T. SP6 + T. Clombta</i>	5.8 ±0.07 a	6.4 ±0.06 a	7.3 ±0.07 c	7.9 ±0.07 c
Tri-HB®	5.2 ±0.07 c	5.4 ±0.07 b	6.9 ±0.08 d	7.4 ±0.06 d
Captan® (control)	5.2 ±0.14 c	5.3 ±0.12 b	6.7 ±0.15 d	7.6 ±0.1 cd
CV (%)	14.9	12.7	13.7	10.6
F	8.65	37.1	90.23	165.91
<i>p</i>	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001

Medias (± error estándar) con diferente literal en una columna son estadísticamente diferentes entre sí (DMS,  $p \leq 0.05$ ,  $n= 60$ ); CV = coeficiente de variación.

Por el contrario, los tratamientos Tri-HB® y Captan® mostraron los valores menores de altura de plantas de *C. chinense* en las últimas dos mediciones, con 6.7 a 6.9 y 7.4 a 7.6 cm a los 21 y 28 días, respectivamente (Cuadro 2).

### Diámetro de tallo

A los siete días después de la germinación (aplicación de los tratamientos) existió diferencia significativa ( $F= 107.28$ ,  $p= 0.00001$ ) en el diámetro de tallo de plantas de *C. chinense*. La co-inoculación permitió un mayor diámetro de tallo con 1.4 mm en comparación con las plantas inoculadas con los otros tratamientos, los cuales oscilaron entre 1.2 y 1.3 mm (Cuadro 3). en las últimas tres mediciones, oscilando entre 1.4 mm y 1.9 mm de diámetro de tallo (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Diámetro de tallo (mm) de plantas de *Capsicum chinense* var. “Chichen Itza” inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. y aplicación de Captan®.**

Tratamiento	Días después de la germinación			
	7	14	21	28
<i>Trichoderma</i> sp. (Clombta)	1.3 ±0.03 b	1.8 ±0.03 a	2.4 ±0.05 a	2.6 ±0.04 a
<i>Trichoderma</i> sp. (SP6)	1.2 ±0.03 c	1.5 ±0.03 b	1.8 ±0.04 b	2.3 ±0.06 b
<i>T. SP6 + T. Clombta</i>	1.4 ±0.02 a	1.6 ±0.03 b	1.8 ±0.03 b	2 ±0.04 c
Tri-HB®	1.3 ±0.03 b	1.4 ±0.04 c	1.6 ±0.02 c	1.9 ±0.04 cd
Captan® (control)	1.2 ±0.02 c	1.3 ±0.03 c	1.4 ±0.02 d	1.8 ±0.04 d
CV (%)	9.2	10.27	11.25	12.33
F	107.28	25.17	107.07	41.04
<i>p</i>	0.00001	0.00001	0.00001	0.00001

Medias (± error estándar) con diferente literal en una columna son estadísticamente diferentes entre sí (DMS,  $p \leq 0.05$ ,  $n= 60$ ); CV= coeficiente de variación.

En las siguientes tres mediciones (14, 21 y 28 días), el análisis mostró que la aplicación de *Trichoderma* sp. Clombta incrementó significativamente (14 días:  $F= 25.17$ ,  $p= 0.00001$ ; 21 días:  $F= 107.07$ ,  $p= 0.00001$  y 28 días:  $F= 41.04$ ,  $p= 0.00001$ ) el diámetro de tallo de plantas de *C. chinense* en comparación con el resto de los tratamientos, con valores promedio de 1.8, 2.4 y 2.6 mm a los 14, 21 y 28 días, respectivamente. Por el contrario, las plantas tratadas con Tri-HB<sup>®</sup> y Captan<sup>®</sup> mostraron los valores menores

### Número de hojas y área foliar

Los resultados indicaron que existió diferencia significativa ( $F= 4.6$ ,  $p= 0.0023$ ) en cuanto al número de hojas en plantas de *C. chinense* por efecto de la aplicación de los tratamientos. *Trichoderma* sp. Clombta significativamente incrementó el número de hojas verdaderas de las plantas de *C. chinense*, mostrando un valor de 9.1 hojas por planta. Las plantas tratadas con la Co-inoculación, Tri-HB<sup>®</sup> y Captan mostraron el número menor de hojas con 8.3, 8.3 y 8.5, respectivamente (Cuadro 4). De igual manera para el área foliar, *Trichoderma* sp. Clombta favoreció un mayor valor en comparación con las plantas inoculadas con los otros tratamientos, con un promedio por hoja de 10.2 cm<sup>2</sup> ( $F= 60.17$ ,  $p= 0.00001$ ), mientras que los tratamientos que permitieron menor área foliar fueron Captan<sup>®</sup> y Tri-HB<sup>®</sup> con 5.8 y 6.4 cm<sup>2</sup>, respectivamente (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Numero de hojas y área foliar (cm<sup>2</sup>) de plantas de *Capsicum chinense* var. “Chichen Itza” inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. y con aplicación de Captan<sup>®</sup>.**

Tratamiento	Núm. hojas	Área foliar
<i>Trichoderma</i> sp. (Clombta)	9.1 ±0.2 a	10.2 ±0.2 a
<i>Trichoderma</i> sp. (SP6)	8.9 ±0.2 bc	7.3 ±0.2 c
<i>T. SP6</i> + <i>T. Clombta</i>	8.3 ±0.1 d	8.4 ±0.2 b
Tri-HB <sup>®</sup>	8.3 ±0.2 d	6.4 ±0.2 d
Captan <sup>®</sup> (control)	8.5 ±0.2 cd	5.8 ±0.2 d
CV (%)	1.42	2.22
F	4.6	60.17
<i>p</i>	0.0023	0.00001

Medias (± error estándar) con diferente literal en una columna son estadísticamente diferentes entre sí (DMS,  $p \leq 0.05$ ,  $n= 60$ ); CV= coeficiente de variación.

### Índice relativo de clorofila

En la primera evaluación (siete días después de la germinación) se encontró una diferencia significativa ( $F= 9.71$ ,  $p= 0.00001$ ) en el índice de clorofila. Las plantas inoculadas con *Trichoderma* sp. Clombta mostraron mayor índice de clorofila con un valor promedio de 162.5 (en una escala de 0 - 999), este valor fue superior en comparación con el resto de las plantas inoculadas con los otros tratamientos, los cuales oscilaron entre 100 a 123.7 (Cuadro 5). En la segunda medición (14 días) no se encontraron diferencias significativas ( $F= 1.93$ ,  $p= 0.1215$ ), los valores oscilaron entre 139.6 (Captan<sup>®</sup>) y 155.7 (*Trichoderma* sp. Clombta) (Cuadro 5).



A los 21 días, el ANDEVA indicó que la aplicación de *Trichoderma* sp. Clombta nuevamente incrementó el índice de clorofila ( $F= 90.23$ ,  $p= 0.00001$ ) en plantas de *C. chinense*. Mientras que en la última medición (28 días), la aplicación de *Trichoderma* sp. Clombta (209.9) y *Trichoderma* sp. SP6 (204.0) incrementaron significativamente ( $F= 165.91$ ,  $p= 0.00001$ ) el índice de clorofila de las plantas en comparación con el resto de los tratamientos, donde los valores promedios oscilaron entre 149.9 y 153.9. Por el contrario, las plantas tratadas con Captan® y Tri-HB® mostraron los menores índices de clorofila en las últimas dos mediciones, con valores entre 120 a 149.9 y 151.3 a 153.9 a los 21 y 28 días, respectivamente (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Índice relativo de clorofila de plantas de *Capsicum chinense* var. “Chichen Itza” (en una escala de 0 a 999) inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* sp. y con aplicación de Captan®.**

Tratamiento	Días después de la germinación			
	7	14	21	28
<i>Trichoderma</i> (Clombta)	162.5 ±6.8 a	155.7 ±4.5 a	206.5 ±5.1 a	209.9 ±4.3 a
<i>Trichoderma</i> (SP6)	123.7 ±6 b	151.6 ±5.8 b	174.9 ±9 b	204 ±5.9 a
<i>T. SP6</i> + <i>T. Clombta</i>	120.8 ±7.5 bc	152.2 ±8 b	154.1 ±5.2 c	153.4 ±9.9 b
Tri-HB®	100 ±10.6 c	134.1 ±4.2 c	151.3 ±4.3 c	153.9 ±6.5 b
Captan® (control)	113 ±5.7 bc	139.6 ±9.2 c	120 ±4.4 d	149.9 ±8.9 b
CV (%)	4.15	2.87	2.48	2.03
F	9.71	1.93	29.09	14.21
p	0.00001	0.1215	0.00001	0.00001

Medias (± error estándar) con diferente literal en una columna son estadísticamente diferentes entre sí (DMS,  $p \leq 0.05$ ,  $n= 10$ ); CV= coeficiente de variación.

### Biomasa aérea y radical (fresca y seca)

Al final del experimento (28 días) se encontró una diferencia significativa en cuanto a la biomasa aérea fresca ( $F= 25.87$ ,  $p= 0.00001$ ) y seca ( $F= 40.14$ ,  $p= 0.00001$ ). La biomasa aérea fresca en plantas inoculadas con *Trichoderma* sp. Clombta mostraron mayor peso en comparación con las plantas inoculadas con los demás tratamientos, con 0.8 g planta<sup>-1</sup>; mientras que los tratamientos con el menor peso fueron la Co-inoculación y el Tri-HB® con 0.5 g planta<sup>-1</sup> en ambos casos (Cuadro 6). Para la biomasa aérea seca, de igual manera, plantas inoculadas con *Trichoderma* sp. Clombta mostraron mayor peso (0.13 g planta<sup>-1</sup>) en comparación con los demás tratamientos; la menor biomasa aérea seca se encontró en la Co-inoculación y Tri-HB® con 0.07 y 0.05 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente (Cuadro 6).

Para la biomasa radical fresca, el ANDEVA indicó una diferencia significativa ( $F= 3.26$ ,  $p= 0.0164$ ) entre los tratamientos. Las plantas inoculadas con *Trichoderma* sp. Clombta (0.12 g planta<sup>-1</sup>) y *Trichoderma* sp. SP6 (0.11 g planta<sup>-1</sup>) obtuvieron mayor peso en comparación con plantas inoculadas con Tri-HB® (0.05 g planta<sup>-1</sup>); sin embargo, ambos tratamientos resultaron presentaron valores estadísticamente iguales a las plantas no inoculadas y tratadas con Captan® (0.09 g planta<sup>-1</sup>). Finalmente, para la biomasa radical seca se encontró una diferencia significativa ( $F= 25.47$ ,  $p= 0.00001$ ) entre los tratamientos, plantas inoculadas con

*Trichoderma* sp. Clombta ( $0.04 \text{ g planta}^{-1}$ ) mostraron un mayor peso radical seco en comparación con el resto de los tratamientos; por el contrario, los tratamientos con el menor peso fueron Captan® y Tri-HB® con  $0.01$  y  $0.02 \text{ g planta}^{-1}$ , respectivamente (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Biomasa aérea y radical (fresca y seca en g) de plantas de *Capsicum chinense* var. “Chichen Itza” inoculadas con dos cepas de *Trichoderma* sp. y con aplicación de Captan®.**

Tratamiento	Biomasa fresca		Biomasa seca	
	Aéreo	Radicular	Aéreo	Radicular
<i>Trichoderma</i> (Clombta)	$0.8 \pm 0.02$ a	$0.12 \pm 0.01$ a	$0.13 \pm 0.003$ a	$0.04 \pm 0.001$ a
<i>Trichoderma</i> (SP6)	$0.6 \pm 0.01$ b	$0.11 \pm 0.03$ a	$0.09 \pm 0.003$ b	$0.02 \pm 0.001$ bc
<i>T. SP6</i> + <i>T. Clombta</i>	$0.5 \pm 0.02$ c	$0.08 \pm 0.01$ ab	$0.07 \pm 0.003$ cd	$0.03 \pm 0.001$ b
Tri-HB®	$0.5 \pm 0.03$ c	$0.05 \pm 0.01$ b	$0.05 \pm 0.003$ d	$0.01 \pm 0.0006$ c
Captan® (control)	$0.7 \pm 0.04$ b	$0.09 \pm 0.02$ a	$0.08 \pm 0.006$ c	$0.02 \pm 0.002$ c
CV (%)	2.43	8.56	3.08	3.22
F	25.87	3.26	40.14	25.47
p	0.00001	0.0164	0.00001	0.00001

Medias ( $\pm$  error estándar) con diferente literal en una columna son estadísticamente diferentes entre sí (DMS,  $p \leq 0.05$ ,  $n=10$ ); CV= coeficiente de variación.

## Discusión

En el presente estudio se encontró que los tratamientos evaluados mostraron diferentes habilidades para evitar la incidencia del Damping off. La aplicación de la cepa de *Trichoderma* Clombta y su co-inoculación con *Trichoderma* sp. SP6 no permitieron la aparición de síntomas y muerte de plantas de *C. chinense* por Damping off. Sin embargo, la incidencia de la enfermedad fue baja en el control químico (5% en Captan®), a pesar de ello, la cepa de *Trichoderma* sp. brindaron protección a las plantas.

Está ampliamente documentado que *Trichoderma* puede inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos fitopatógenos. El efecto inhibitorio de las cepas de *Trichoderma* en hongos fitopatógenos se puede asociar a la producción de enzimas que actúan contra la pared celular de los mismos (Guédez *et al.*, 2012). En la literatura se han reportado beneficios de la biofertilización en *C. chinense* Jacq. Por ejemplo, Candellero *et al.* (2015) reportaron incrementos de 55.57 y 47.62% en la altura de plantas de *C. chinense* inoculadas con *Trichoderma* sp. Th05-02 y *T. virens*. Del mismo modo, *T. harzianum* fue capaz de incrementar 41.57 y 55% la longitud y volumen de raíz de *C. chinense*, respectivamente.

En el cultivo de *Capsicum annuum*, Guigón-López y González-González (2004) reportaron la habilidad de seis cepas de *Trichoderma* para controlar *in vitro* al agente causal del Damping off (*Phytophthora capsici*). Las cepas TS01, TC74 y TvB de *Trichoderma* mostraron mayor actividad micoparasítica *in vitro*. Mientras que en invernadero, las cepas TC74 y TS01 a concentraciones de  $1.3 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , redujeron la velocidad de crecimiento y la severidad del marchitamiento de plantas de *C. annuum* causadas por *P. capsici*. Como en este estudio, las cepas evaluadas por Guigón-López y González-González (2004) incrementaron la altura (30%), número de hojas (20%), área foliar (30%), y biomasa aérea (60%) y radical (38) de plantas de *C. annuum*.

En otro estudio, Mehetre y Kale (2011) reportaron la capacidad de *Trichoderma harzianum* para parasitar a *Pythium aphanidermatum* en condiciones *in vitro* en cultivos duales; además, en experimentos en macetas, *T. harzianum* inhibió un 83.16% el progreso del Damping off causado por *P. aphanidermatum* en plantas de *C. annuum*. Asimismo, Cárdenas *et al.* (2005) compararon la eficiencia del hongo *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum*, agente causal del Damping off en papaya (*C. papaya* L.).

Los bioensayos revelaron que la aplicación de *Trichoderma* sp. a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  controló la enfermedad. Reyes *et al.* (2012) sugieren que *Trichoderma* sp. actúa como agente de control biológico, y que sus mecanismos de acción se basan en la activación de múltiples rutas metabólicas que promueven la competencia por nutrientes y espacio, la modificación de las condiciones ambientales, el estímulo del crecimiento y la activación de mecanismos defensivos de las plantas por antibiosis y micoparasitismo.

Además del desplazamiento y control de microflora deletérea de la raíz, diferentes especies de *Trichoderma* incrementan el crecimiento radical y desarrollo de las plantas. Esto se confirmó en las plantas de *C. chinense*, ya que la aplicación de *Trichoderma* sp. Clombta incrementó la altura, diámetro y biomasa radical de las mismas. Cada cepa y especie de *Trichoderma* posee diferente habilidad para la promoción del crecimiento vegetal, por ello se observó que *Trichoderma* sp. Clombta fue superior a *Trichoderma* SP6 en tres variables de crecimiento vegetal. Posiblemente, ambas cepas son especies diferentes, y por ello, poseen habilidades bioquímicas diferentes (p. e. producción de auxinas y ácidos orgánicos y solubilización de fosfatos inorgánicos) que permiten que una cepa sea mejor promotora de crecimiento a comparación de otra (Ortuño *et al.*, 2013).

Asimismo, las interacciones fúngicas inter-específicas e intra-específicas juegan un papel importante a la hora de desarrollar productos biológicos o inoculaciones con más de una cepa o especie (Ortuño *et al.*, 2013; Moo-Koh *et al.*, 2018). El presente trabajo es el preámbulo para futuras investigaciones en hortalizas con la cepa de *Trichoderma* sp. Clombta, por ejemplo, su evaluación en campo o invernadero para conocer su efectividad en la inhibición de hongos fitopatógenos en la etapa de trasplante y producción de *C. chinense*. Asimismo, es necesario identificar a nivel especie esta cepa y conocer cuáles son los mecanismos particulares involucrados en los procesos de promoción de crecimiento vegetal de esta cepa.

## Conclusiones

La aplicación semanal de *Trichoderma* sp. Clombta a concentración de  $1 \times 10^{13}$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  dio indicios de reducir la incidencia de los agentes causales del “Damping off” en plantas de *C. chinense* Var. “Chichen Itza” y fue capaz de promover el crecimiento vegetativo, al incrementar la altura, diámetro de tallo, biomasa aérea y radicular, número de hojas e índice de clorofila de las plantas inoculadas. *Trichoderma* sp. Clombta es un buen candidato para ser estudiado como biofungicida y biofertilizante en plantaciones y semilleros de chile habanero bajo las condiciones climáticas de Tecomán, Colima, México.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el programa SEP-PRODEP para el desarrollo del presente estudio.

## Literatura citada

- Aguirre, M. J. F. y Espinosa M. J. A. 2016. Crecimiento y rendimiento de *Capsicum annuum* L. inoculado con endomicorriza y rizobacteria. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 7:1539-1550.
- Cabezas, G. M.; Peña, F.; Duarte, H. W.; Colorado, J. F. y Lora, S. L. 2009. Un modelo para la estimación del área foliar en tres especies forestales de forma no destructiva. Revista U. D. C. A. Actualidad & Divulgación Científica. 1:121-130.
- Candelero, D. J.; Cristóbal, A. J.; Reyes, R. A.; Tun, S. J. M.; Gamboa, A. M. M. y Ruíz, S. E. 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plantass de *Capsicum chinense* Jacq. y antagonicas contra *Meloidogyne incognita*. Phytan Int. J. Exp. Bot. 84:113-119.
- Cárdenas, J. C. G.; Maruri, G. J. M. y Acosta, G. A. 2005. Evaluación de diferentes concentraciones de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* agente causal de la pudrición de plántulas en papaya (*Carica papaya* L.) en Tuxpan, Veracruz, México. Revista UDO Agrícola. 5:45-47.
- Chirino, V. I.; Kandula, D.; Littejohn, C.; Hill, R.; Wlaker, M. Shields, M.; Cummings, N.; Heittiarachchi, D. y Wratten, S. 2016. Potential of the beneficial fungus *Trichoderma* to enhance ecosystem-services provision in the biofuel grass *Miscanthus x giganteus* in agriculture. Sci. Rep. 6:1-7.
- Cigales, M. y Pérez, O. 2011. Variabilidad de suelos y requerimiento hídrico del cultivo de banano en una localidad del pacífico de México. Avances en Investigación Agropecuaria. 15:21-31.
- Ezziyyani, M.; Pérez, S. C.; Sid, A. A.; Requena, M. E. y Candela, M. E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). An. Biol. 26:35-45.
- Guédez, C.; Cañizalez, L.; Castillo, C.; y Olivar, R. 2012. Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 32:44-49.
- Guigón, L. C. y González, G. P. A. 2004. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. con actividad antagonica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.). Rev. Mex. Fitopatol. 22:117-124.
- Hernández, M. J. L.; Sánchez, P. M. I.; García, O. J. G.; Mayek, P. N.; González, P. J. M y Quiroz, V. J. D. C. 2011. Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del noreste de México. Rev. Colom. Biotechnol. 8:176-185.
- Hoyos, C. L.; Chaparro, P.; Abramsky, M.; Chet, I. y Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. Agron. Colomb. 26:451-458.
- Lezama, G. R.; Reyes, M. J. G.; Bárbara, R. M.; Ángel, S. C. A.; Galindo, V. E.; López, L. M. y Molina, O. J. 2006. Uso de *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) para el control de *Rhinophorus palmarum* (Coleóptera: Curculionidae) en campo. In: Entomología Mexicana. Estrada V.E.G.; Romero N. J.; Equihua M.A.; Luna L.C. y Rosas A. J. L. (Edit.), Sociedad Mexicana de Entomóloga, México. 596-600 pp.
- Mahdavi, S.; Kafi, M.; Fallahi, E.; Shokrpour, M. y Tabrizi, L. 2017. Drought and biostimulant impacts on mineral nutrients, ambient and reflected lighth-based chlorophyll index, and performance of perennial ryegrass. J. Plant Nutr. 40:2248-2258.

- Mehetre, S. y Kale, S. 2011. Comparative efficacy of thermophilic bacterium, *Bacillus licheniformis* (NR1005) and antagonistic fungi, *Trichoderma harzianum* to control *Pythium aphanidermatum*-induced damping off in chili (*Capsicum annum* L.). Arch Phytopathology Plant Protec. 44:1068-1074.
- Michel, A., A. C.; Otero, S. M. A.; Solano, P. L.; Ariza, F. R.; Barrios, A. A. y Rebolledo, M. A. 2009. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la “Escoba de Bruja” del mango (*Mangifera indica* L.) Rev. Mex. Fitopatol. 27:18-26.
- Mojica, M. V.; Luna, O. H. A.; Sandoval, C. C. F.; Pereyra, A. B.; Morales, R. L. H.; González, A. N. A.; Hernández, L. C. E. y Alvarado, G. O. G. 2009. Control biológico de la marchitez del chile por *Bacillus thuringiensis*. Phytan Int. J. Exp. Bot. 78:105-110.
- Moo, K. F. A.; Cristobal, A. J.; Reyes, R. A.; Tun, S. J. M.; Gamboa, A. M.; Islas, F. I. R. 2018. Incompatibilidad interespecífica de especies de *Trichoderma* contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum*. Scientia Fungorum. 47:37-45.
- Mukherjee, M.; Murherjee, P. K.; Horwitz, B. A.; Zachow, C.; Berg, G. y Zeilinger, S. 2012. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control. Indian J. Microbiol. 52:522-529.
- Naseby, D. C.; Pascual, J. A. y Lynch J. M. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and enzyme activities. J. Appl. Microbiol. 88:161-169.
- Ocampo, T. P. 2014. Diagnóstico histórico de la producción de chile habanero, papaya, plátano y miel en el sureste de México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Informe Técnico del Proyecto. 17-51 pp.
- Ortuño, N.; Miranda, C. y Claros, M. 2013. Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundario de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. Journal of the Selva Andina Biosphere. 1:16-32.
- Reyes, R. A.; Cristóbal, A. J.; Ruiz S. E. y Tun, S. J. M. 2012. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con hongos antagonistas. Fitosanidad. 16:161-165.
- SAGARPA. 2018. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/boletines/Paginas/BNSAGENE052017.aspx>.
- SAGARPA. 2029. Planeación agrícola nacional 2017-203, chiles y pimientos mexicanos. <https://www.gob.mx/cms/uploads/.../file/.../Potencial-Chiles.y.Pimientos-parte-uno.pdf>.
- Sánchez, R. J. C.; Jurado, G. C.; Manzo, S. G.; Barreto, T. M. A.; Molina, O., J. y Chan, C., W. 2016. Biocontrol of damping-off disease in *Carica papaya* (Linnaeus) seedlings under greenhouse conditions using *Trichoderma* spp. Conference Proceeding of 3rd Biotechnology Summit, Cd. Obregón, Sonora, México. 3:127-132.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Producción agrícola, ciclo: ciclos y perenes 2018. Recuperado de: <http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola-siap-gobmx/AvanceNacionalCultivo.do>.
- Tavera, Z., D. D.; Hernández, E, J. J.; Ulibarri, G. y Sánchez, Y., J., M. 2017. Inoculación de *Trichoderma harzianum* en *Zea mays* y su efecto a la adición del fertilizante nitrogenado al 50%. Journal of the Selva Andina Research Society. 8:115-123.