



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
DES DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS CAMPUS V

**Formulación de fungicida a base de *Origanum vulgare* L.,
Tradescantia spathacea Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe para el
manejo de *Moniliophthora roreri* *Theobroma cacao* L.**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA
TROPICAL**

Por

LUZ ELENA TAMAYO ESPAÑA

Directora

Dra. SANDRA ISABEL RAMÍREZ GONZÁLEZ

**Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
Febrero, 2016**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
CAMPUS V
DIRECCIÓN



VILLAFLORES, CHIAPAS
02 DE FEBRERO DE 2016
OFICIO N° D/157/16

C. LUZ ELENA TAMAYO ESPAÑA

MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
P R E S E N T E.

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado, designado para su evaluación profesional, de la tesis titulada: **“Formulación de fungicida a base de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe para el manejo de *Moniliophthora roreri* de *Theobroma cacao* L.”**, por este conducto le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR”

M. C. JAIME LLAVÉN MARTÍNEZ
DIRECTOR



C. c. p. Archivo

DEDICATORIA

A Dios,

Por su amor incondicional, por guiarme y por darme la oportunidad de culminar mis estudios de manera satisfactoria, ya que sin su bendición no hubiese sido posible cumplir este sueño.

A mis padres Roque y Luz,

Porque a pesar de la distancia que nos separa, siempre han estado a mi lado brindándome su apoyo, amor, cariño y comprensión. Gracias inmensas por ser mis padres

A mis hermanos, primos, sobrinos y demás familiares,

Que de una u otra manera me apoyaron en este largo recorrido.

A mi esposo William Jáuregui,

Por ser el compañero de mi vida y porque ha estado a mi lado en todo momento, incluso en los más turbulentos. Gracias por tu amor.

A mi pequeña hija Fátima,

Porque a pesar de su corta edad ha estado al pendiente de cada paso que he dado para culminar mis estudios y, por ser el motor de mi vida.

A mis suegros Martha y Miguel,

Por el apoyo que me han brindado y por los consejos de aliento que me ayudaron a afrontar los obstáculos encontrados.

A mi cuñado Paco,

Porque más que mi cuñado es mi hermano, gracias por demostrarme de manera desinteresada tu apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por todo el apoyo financiero brindado a lo largo de mis estudios para el desarrollo y conclusión de la presente investigación.

A la Universidad Autónoma de Chiapas, por haberme aceptado y permitido ser parte de ella, así como también a los diferentes docentes que me brindaron su apoyo y su conocimiento para llevar a cabo esta investigación.

A la Dra. Sandra Isabel Ramírez González; directora de tesis, por brindarme su apoyo, por compartir sus experiencias, su paciencia y su motivación día a día. Gracias por sus apreciados aportes, críticas y comentarios para culminar de la mejor manera con la presente investigación.

Al Dr. Orlando López Báez; asesor, por brindarme su orientación y por los valiosos aportes, sugerencias y comentarios realizados en el tema de investigación. Por su compartir sus experiencias profesionales, por guiarme y orientarme en este recorrido.

Al Dr. Saúl Espinosa Zaragoza; asesor, por su colaboración y tiempo brindado para el desarrollo del tema de tesis. Agradezco su apoyo incondicional y sus sabios consejos para finalizar este proyecto.

Al Dr. Ricardo René Quiroga Madrigal; asesor, quien siempre está disponible para cualquier duda o consulta presentada en el desarrollo de mi tesis. Le agradezco por sus consejos y por el apoyo proporcionado para llegar al final de este camino.

A la M.C. María de los Ángeles Rosales Esquinca, Coordinadora de Investigación y Posgrado, por su valioso apoyo y su constante espíritu servicial que me permitió culminar con el desarrollo de mi trabajo.

A mis amigos, Adriana, Diego, Ana, Sara, Irving, Carlos, Isidro, Nina, Laura, Wendy, Andrea, Azucena, Guillermo, Santiago, por sus palabras de aliento y por su valiosa amistad que me han brindado a lo largo de mis estudios. Gracias por ser parte fundamental en mi desarrollo profesional.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS CAMPUS V

Esta tesis titulada Formulación de fungicida a base de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe para el manejo de *Moniliophthora roreri* de *Theobroma cacao* L, forma parte del proyecto de investigación “Diseño e instalación de una planta piloto para el preescalamiento y validación de biofungicidas para el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), como estrategia para la recuperación del cacao en México” registrado en la Coordinación de Investigación y Posgrado de la UNACH, financiado por el fondo de Innovación Tecnológica del CONACYT (000000000193226) y Secretaría de Economía, bajo la dirección de la Dra. Sandra Isabel Ramírez González.

Se incluye en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: AGROECOLOGÍA Y AGRICULTURA ORGÁNICA, del CUERPO ACADÉMICO EN AGRICULTURA TROPICAL ECOLÓGICA.

Se incluye en la línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: Sistemas Agrícolas Tropicales, del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS CAMPUS V

Esta tesis titulada Formulación de fungicida a base de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe para el manejo de *Moniliophthora roreri* de *Theobroma cacao* L, fue realizada por la Ing. LUZ ELENA TAMAYO ESPAÑA, bajo la dirección y asesoría del Comité Tutorial indicado, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA



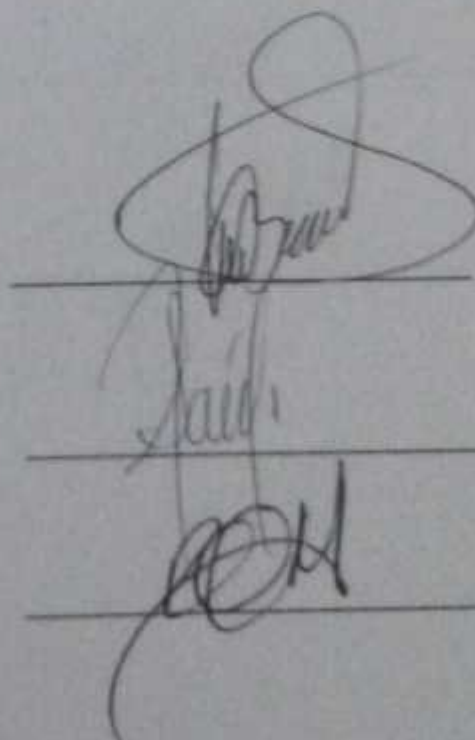
Dra. SANDRA ISABEL RAMÍREZ GONZÁLEZ

ASESORES:

Dr. ORLANDO LÓPEZ BÁEZ

Dr. SAÚL ESPINOSA ZARAGOZA

Dr. RICARDO RENÉ QUIROGA MADRIGAL

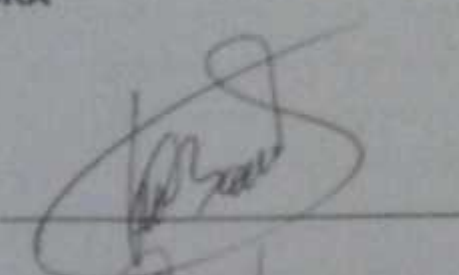


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS CAMPUS V

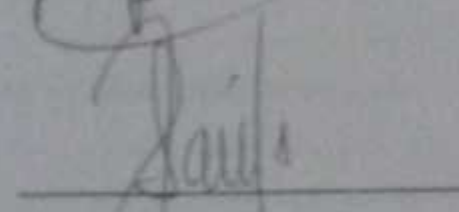
Esta tesis titulada Formulación de fungicida a base de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe para el manejo de *Moniliophthora roreri* de *Theobroma cacao* L. fue realizada por la Ing. LUZ ELENA TAMAYO ESPAÑA, ha sido aprobada por la Comisión Revisora indicada, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMISIÓN REVISORA

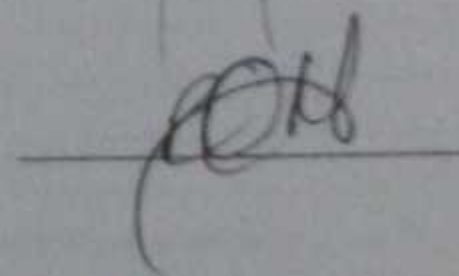
Dr. ORLANDO LÓPEZ BÁEZ



Dr. SAÚL ESPINOSA ZARAGOZA



Dr. RICARDO RENÉ QUIROGA MADRIGAL



CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
1.2 Hipótesis.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Generalidades del cacao: Origen y distribución	4
2.2 El cultivo de cacao en México	5
2.3 Moniliasis (<i>Moniliophthora roreri</i>)	7
2.3.1 Origen y distribución	7
2.3.2 Importancia económica	8
2.3.3 Etiología	9
2.3.4 Sintomatología	10
2.3.5 Ciclo de vida de <i>Moniliophthora roreri</i>	11
2.3.6 Epidemiología	13
2.3.7 Métodos de control de la moniliasis	14
2.4 Tecnologías generadas para el manejo orgánico de <i>Moniliophthora roreri</i>	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Ubicación geográfica.....	26
3.2 Materiales.....	26
3.2.1 Material biológico.....	26
3.2.2 Material de laboratorio	26
3.3 Métodos.....	26
3.3.1 Fase 1. Determinación de la relación óptima de soluto y solvente	27
3.3.1.1 Multiplicación del hongo <i>Moniliophthora roreri</i>	27
3.3.1.2 Obtención de hidrolatos	28
3.3.1.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para los hidrolatos obtenidos	29
3.3.2 Fase 2. Determinación de mezclas de hidrolatos	30
3.3.3 Fase 3. Evaluación de condiciones de almacenaje	31

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1	Fase 1. Determinación de la relación óptima de soluto y solvente	34
4.1.1	Evaluación del extracto de orégano sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i>	35
4.1.2	Evaluación del extracto de maguey morado sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i>	38
4.1.3	Evaluación del extracto de jengibre sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de <i>Moniliophthora roreri</i>	41
4.2	Fase 2. Determinación de mezclas de hidrolatos	44
4.2.1	Efecto de mezclas de dos extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	44
4.2.2	Efecto de mezclas de tres extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	47
4.3	Fase 3. Evaluación de condiciones de almacenaje	50
4.3.1.	Efecto de la mezcla de los destilados de maguey morado y jengibre a los ocho meses de su obtención sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	50
4.3.2.	Efecto de los hidrolatos de orégano, maguey morado y jengibre a los ocho meses de su obtención sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	54
4.3.3.	Características (color, olor y sedimentación) de los destilados de orégano, maguey morado y jengibre a los ocho meses de almacenaje	58
5.	CONCLUSIONES.....	68
6.	RECOMENDACIONES	69
7.	LITERATURA CITADA.....	70
8.	APÉNDICE	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Material vegetal evaluado.....	26
Cuadro 2. Tratamientos de orégano, maguey morado y jengibre.....	29
Cuadro 3. Proporciones de volumen para la elaboración de las mezclas.....	31
Cuadro 4. Tratamientos evaluados con base a los resultados obtenidos en la fase dos (ocho meses).....	32
Cuadro 5. Tratamientos evaluados con base a los resultados obtenidos en la fase uno (ocho meses).....	33
Cuadro 6. Tiempo utilizado para la destilación de orégano, maguey morado y jengibre.....	34
Cuadro 7. Efecto del extracto de orégano sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	37
Cuadro 8. Efecto del extracto de maguey morado sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	39
Cuadro 9. Efecto del extracto de jengibre sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	43
Cuadro 10. Efecto de dos extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	46
Cuadro 11. Efecto de tres extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	48
Cuadro 12. Efecto de los extractos de maguey morado y jengibre en proporciones (1:1 y 1:2) a los ocho meses de su obtención sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	52
Cuadro 13. Efecto de los extractos de orégano, maguey morado y jengibre a los ocho meses de su obtención sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de <i>M. roreri</i>	56
Cuadro 14. Características del hidrolato de orégano fresco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.....	59
Cuadro 15. Características del hidrolato de orégano seco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.....	60
Cuadro 16. Características del hidrolato de maguey morado fresco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.....	61
Cuadro 17. Características del hidrolato de maguey morado seco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.....	62
Cuadro 18. Características del hidrolato de jengibre fresco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.....	63
Cuadro 19. Características del hidrolato de jengibre seco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.....	64
Cuadro 20. Comparación del hidrolato de orégano al momento de su obtención y a los ocho meses de almacenaje.....	65
Cuadro 21. Comparación del hidrolato de maguey morado al momento de su obtención y a los ocho meses de almacenaje.....	66
Cuadro 22. Comparación del hidrolato de jengibre al momento de su obtención y a los ocho meses de almacenaje.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Probable diseminación de la moniliasis del cacao en América.....	8
Figura 2. Estructuras morfológicas de <i>M. roreri</i>	9
Figura 3. Ciclo de vida del hongo <i>Moniliophthora roreri</i>	12
Figura 4. Diseño de la investigación.....	27
Figura 5. Aislamiento del patógeno.....	28
Figura 6. Procedimiento general para la elaboración de hidrolatos.....	28
Figura 7. Crecimiento micelial del hongo <i>Moniliophthora roreri</i>	30
Figura 8. Conidia de <i>Moniliophthora roreri</i> desarrollando el tubo germinativo....	30
Figura 9. Aspecto del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> por efecto del extracto de orégano.....	35
Figura 10. Aspecto del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> por efecto del extracto de maguey morado.....	38
Figura 11. Aspecto del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> por efecto del extracto de jengibre.....	42
Figura 12. Aspecto del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> por efecto de dos extractos vegetales.....	45
Figura 13. Aspecto del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> por efecto de tres extractos vegetales.....	47
Figura 14. Aspecto del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> por efecto de los destilados de maguey morado y jengibre a los 8 meses de su obtención.....	50
Figura 15. Aspecto del crecimiento micelial de <i>M. roreri</i> por efecto de los destilados de orégano maguey morado y jengibre a los 8 meses de su obtención.....	54

RESUMEN

La moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.), causada por el hongo *Moniliophthora roreri*, es una enfermedad reportada en México desde 2005, y puede ocasionar pérdidas hasta de 100% en la producción sino se ejercen medidas de control. Por ello, algunos productores han optado por el cambio de actividad agrícola, lo cual pone en riesgo la permanencia del cultivo en México. Es importante el uso de estrategias de control de bajo impacto ambiental, las cuales deben ser eficaces y económicamente viables. En la presente investigación se planteó formular un fungicida a base de extractos de plantas que permitan la inhibición del crecimiento y germinación de conidias de *M. roreri* en condiciones de laboratorio. Se plantearon tres fases: en la primera se determinó la relación soluto-solvente en el proceso de extracción mediante destilación de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roreri*. Los extractos fueron elaborados con material vegetal fresco y seco a dos relaciones agua-alcohol (10:0, 10:1) y evaluados en proporciones de 50, 40, 30, 20 y 10% v/v. En la segunda fase se definieron las mejores mezclas de los destilados y en la tercera fase se establecieron las condiciones de almacenaje para la conservación del fungicida. Los resultados muestran que las tres plantas evaluadas tienen diferentes porcentajes de actividad antifúngica sobre el crecimiento y la germinación de conidias de *M. roreri*. En ensayos *in vitro*, los extractos estudiados presentaron inhibición del 100% a 50 y 40% v/v, siendo su concentración mínima inhibitoria (CMI) de 40%, tanto en material fresco como seco; sin embargo, se observó que los tratamientos de orégano (O1), maguey morado (M1) y jengibre (J1) fueron los que mostraron el mejor efecto sobre *M. roreri*; los cuales se obtuvieron con material vegetal fresco (300 g L⁻¹) y la relación agua-alcohol (10:1). Con base en estos resultados, en la segunda fase se encontró que al realizar mezclas de los mejores tratamientos (O1, M1 y J1) al 30% v/v, las mejores mezclas fueron de una parte de maguey morado y una parte de jengibre (T3) y una parte de maguey morado y dos partes de jengibre (T8) con inhibición del micelio del 61 al 63%; además, ningún tratamiento inhibió totalmente la formación de conidias, con porcentajes del 31.96% al 96.89%; los tratamientos T3 y T8 registraron el 100% y 95.87% de inhibición de conidias germinadas. Para la tercera fase, se evaluó la efectividad de las mejores mezclas (T3 y T8) de la fase dos y los tratamientos (O1, M1 y J1) de la fase uno a los ocho meses de su obtención; los resultados indican que el tratamiento de una parte de maguey morado y dos partes de jengibre (T19) en envase ámbar, obtuvo los mejores resultados con 53.69% de inhibición del crecimiento micelial y no permitió la formación ni germinación de conidias. Todos los tratamientos conservaron mejor su efectividad al ser almacenados a 4°C y con respecto al color de recipiente se conservan mejor en color ámbar para el orégano, y para jengibre y maguey en envase transparente. Sin embargo, en todos los tratamientos se registró crecimiento micelial pero fueron capaces de inhibir la cantidad de conidias totales en porcentajes de 98.5% para orégano, 35.18% maguey morado y del 96.01% para el jengibre, en todos los tratamientos inhibieron por completo la germinación de conidias. Se concluye que es posible formular un fungicida a partir de una mezcla de hidrolato de maguey morado y jengibre (1:2 v/v) capaz de inhibir el crecimiento micelial y la formación de conidias de *M. roreri* y almacenarlo en envase opaco a temperatura de 4°C, para su mejor conservación.

Palabras clave: moniliasis del cacao, extractos de plantas, control de patógenos.

ABSTRACT

Frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao* L.), caused by the fungus *Moniliophthora roreri*, is a disease reported in Mexico since 2005, and can cause losses of up to 100 % in production but control measures are exercised. Therefore, some producers have opted for changing agricultural activity, which threatens the permanence of the crop in Mexico. It is important to use control strategies with low environmental impact, which must be effective and economically viable. In this investigation they proposed to formulate a fungicide plant extracts that allow the inhibition of growth and germination of conidia of *M. roreri* under laboratory conditions. Raised three phases: first the solute-solvent ratio in the extraction process was determined by distillation of *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* and *Zingiber officinale* Roscoe Swartz on the inhibition of the growth and formation of conidia of *M. roreri*. Extracts were made from dried fresh plant material and two water- alcohol (10:0, 10:1) relationships and evaluated at rates of 50, 40, 30, 20 and 10 % v/v. In the second phase the best blends of distillates were defined and in the third phase storage conditions for the preservation of the fungicide were established. The results show that the three evaluated plants have different percentages of antifungal activity on the growth and germination of conidia of *M. roreri*. In *in vitro* tests, extracts studied showed 100% inhibition at 50 and 40 % v / v, and its minimum inhibitory concentration (MIC) of 40 %, both fresh and dried material; however, it was observed that treatments oregano (O1), purple agave (M1 and ginger (J1) were those that showed the best effect on *M. roreri*; which they were obtained with fresh plant material (300 g L⁻¹) and the water-alcohol (10:1). Based on these results, in the second phase it was found that the mixes of the best treatments (O1, M1 and J1) to 30% v / v, the best blends were part of purple maguey and some ginger (T3) and a portion of purple maguey and two parts ginger (T8) with inhibition of the mycelium from 61 to 63 %; moreover, no treatment completely inhibited the formation of conidia, with percentages of 31.96 % to 96.89 %; T3 and T8 treatments recorded 100% and 95.87 % inhibition of germinated conidia. For the third phase, the effectiveness of the best mixes (T3 and T8) and phase two treatments (O1, M1 and J1) from phase one to eight months of collection is assessed; the results indicate that treatment of a portion of purple maguey and two parts ginger (T19) amber bottle, obtained the best results with 53.69% inhibition of mycelial growth and did not allow the formation and germination of conidia. All treatments better retained their effectiveness when stored at 4 ° C and for the color container are best stored in amber for oregano and ginger and agave transparent container. However, in all treatments mycelial growth was recorded but were able to inhibit the amount of total conidia porcentajes 98.5% for oregano, 35.18% purple agave and 96.01% for ginger, all treatments completely inhibited germination conidia. It concludes that it is possible to formulate a fungicide from a mixture of purple maguey hidrolato and ginger (1:2 v/v) capable of inhibiting the mycelial growth and conidia formation *M. roreri* and stored in opaque container at room temperature 4 ° C, for better preservation.

Keys words: Frosty pod rot, plant extracts, control of pathogens.

1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta originaria de los trópicos húmedos de América, su centro de origen se cree estar situado en el Noroeste de América del Sur, en la zona amazónica. Su manejo fue extensivo en Mesoamérica, y luego cultivado intensamente por los mayas en México (Mendoza, 2013).

Actualmente, el cacao se cultiva en más de 60 países, la producción se concentra África, Asia, Oceanía, Centro, Norte y Sudamérica. (Quintero y Díaz, 2004) mencionan que el 68 % de la producción mundial de cacao se produce en África, siendo el país líder Costa de Marfil, seguido de Ghana, Nigeria y Camerún. Los países del continente Americano representan un 15% de la producción mundial de cacao. Hoy en día, más de 20 millones de personas de todo el mundo dependen directamente de este cultivo para subsistir. Prácticamente el 90% de la producción de cacao procede de minifundios con superficies inferiores a cinco hectáreas. México tiene un aporte cercano al 1 % a la producción mundial de cacao, procedente de 61,168.10 ha., ubicadas en cuatro estados, siendo Tabasco y Chiapas los mayores productores, generando más de ocho millones de jornales al año, con una contribución de 27,844.12 toneladas, en cuanto a su rendimiento promedio reportado para el año 2014 fue de 0.46 t ha⁻¹ (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México - SAGARPA, 2014).

Desafortunadamente, el cacao se ve afectado por muchas plagas y enfermedades, las cuales reducen la producción y calidad del grano a la vez que aumentan los costos de producción. La moniliasis (*Moniliophthora roreri*) ocasiona pérdidas en rendimiento de acuerdo con las condiciones ambientales, el manejo del cultivo, las medidas de control que se apliquen y las variedades cultivadas. En plantaciones ubicadas en zonas húmedas, con poca tecnificación y sin control, es frecuente observar pérdidas superiores al 90 %. En marzo de 2005 fue detectada por primera vez en plantaciones del municipio de Pichucalco, Chiapas (López *et al.*, 2006).

López *et al.* (2006) mencionan que el manejo de esta enfermedad se basa en la integración de prácticas agronómicas como son la tecnificación, la reducción del inóculo primario, la siembra de clones de alta productividad, y la implementación permanente de prácticas de saneamiento y de manejo cultural. Sin embargo, la poca capacitación a los productores y sus bajos recursos económicos para implementarlos hacen difícil su control. Con respecto al uso de fungicidas de síntesis química para el control de la moniliasis del cacao, han sido ensayados en diferentes lugares; sin embargo, los resultados no son del todo satisfactorios o son inconsistentes de año a año; otro punto que se cuestiona son las altas frecuencias de aplicación y el costo de los productos ya que resulta a menudo antieconómico para el cacaotero. (Meza y León, 1972; Sánchez *et al.*, 2003; Merchán, 1980; Barros, 1982).

En la actualidad, se evalúan cepas nativas de hongos y bacterias para su manejo, los resultados en laboratorio muestran buena eficiencia de control; sin embargo falta aún desarrollarlos. De acuerdo con Sánchez (1982) reportado por López *et al* (2006) la búsqueda de material resistente a *Moniliophthora roreri* se inició desde que se detectó la enfermedad. Desde hace algunos años en Ecuador, Colombia y Costa Rica, se han realizado observaciones de la infección natural de diversos árboles y con inoculaciones artificiales, estas evaluaciones han permitido seleccionar algunos clones con cierto nivel de resistencia. Sin embargo, a la fecha se desconocen resultados concluyentes de las evaluaciones de estos clones y sus descendientes bajo los diferentes ambientes en donde la enfermedad está presente; además, aún es necesario estudiar si esta resistencia es heredable, así como el mecanismo de transmisión de los clones a las descendencias híbridas, y por otra parte, si estas resultan de buen rendimiento y calidad organoléptica.

Diversas investigaciones demuestran el potencial de los extractos de plantas en el manejo de problemas fitosanitarios ocasionados por hongos, (Hernández *et al.*, 2007; Ramírez, 2008a; Barrera y Bautista, 2008), según lo reporta Ramírez *et al* (2011). De acuerdo con Ramírez (2006) reportado por López *et al* (2009), una alternativa de elaboración de extractos es la utilización de técnicas simples y fácilmente reproducibles por los productores elaborándolos a partir de especies vegetales procedentes preferiblemente del mismo agroecosistema, para facilitar su consecución y hacerlo más económico. Ramírez *et al.* (2011) reportaron el efecto inhibitorio en el crecimiento y desarrollo de *Moniliophthora roreri* con extractos obtenidos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe; por lo cual en el presente trabajo se planteó optimizar el proceso de extracción de los extractos, es por ello que se estructuraron tres fases, en la primera se determinó la relación soluto-solvente en el proceso de extracción mediante destilación tanto con material fresco como seco al sol de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *Moniliophthora roreri* en condiciones de laboratorio, en la segunda se definió las mejores mezclas en los destilados y, en la tercera se estableció las condiciones más adecuadas de almacenaje para la conservación del fungicida formulado.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Formular un fungicida a base de extractos de plantas que permitan la inhibición del crecimiento y germinación de conidias de *Moniliophthora roreri* en condiciones de laboratorio y el cual pueda incorporarse en un sistema de producción orgánica en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Determinar la relación soluto-solvente en el proceso de extracción mediante destilación de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *Moniliophthora roreri* en condiciones de laboratorio.
2. Definir *in vitro* las mejores mezclas en los destilados de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre el crecimiento y desarrollo de *Moniliophthora roreri*.
3. Establecer las condiciones y el tiempo de almacenaje para la conservación del fungicida formulado.

1.2 Hipótesis

1. Es posible formular un fungicida a base de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe que sea eficiente en la inhibición del crecimiento y desarrollo de *Moniliophthora roreri* en condiciones de laboratorio.
2. Es posible conservar la efectividad del fungicida formulado por un periodo de ocho meses.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cacao: Origen y distribución

El cacao es un árbol nativo perenne nativo del trópico americano, especialmente de Mesoamérica. Es muy probable que fueran los Olmecas los responsables de su domesticación, hace 3000 mil años, pero se atribuye a los Mayas la difusión de su uso, pues constituyó una parte importante de sus actividades culturales, como alimento, medicina e incluso como parte de su sistema económico, como moneda (Ogata, 2007). Aunque todavía se encuentra en forma silvestre, el cacao se domesticó desde tiempo inmemorial; fue cultivado en Centro y Sudamérica y actualmente a nivel mundial. Su nombre *Theobroma cacao* significa *Theobroma*, del griego, *theo*: Dios, y *broma*: alimento; es decir “alimento de los Dioses”, mientras que el epíteto cacao es un término que proviene del náhuatl y se considera latinizado (Waizel *et al.*, 2012).

Desde la colonización española, el cultivo se ha extendido, a otros países, que hoy son líderes en la producción mundial; se cultiva principalmente en 13 países, como Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún en el continente africano, en el continente americano el mayor productor es Brasil con el 18 %, le siguen Ecuador con el 6 %, Colombia y México contribuyen con el 1 % de la producción mundial de cacao (González, 2008).

Con relación a la superficie destinada al cultivo de cacao en el mundo, Ramírez (2013) afirma que ésta se encuentra alrededor de los siete millones de hectáreas. El 70% de esta área se ubica en África, el 20 % en América y el 8 % en Asia. El rendimiento de la producción de cacao a nivel mundial alcanza un valor promedio de 0.51 t ha^{-1} . Asia presenta el mayor rendimiento a nivel mundial con 0.8 t ha^{-1} , seguido de África con 0.53 t ha^{-1} y, finalmente América con un rendimiento de 0.3 t ha^{-1} . Los países con mayores rendimientos son Granada y Madagascar los cuales son superiores a 0.95 t ha^{-1} , Indonesia y Malasia con rendimientos mayores a 0.8 t ha^{-1} . El Salvador, Santa Lucía y Bolivia con rendimientos entre 1.0 y 0.73 t ha^{-1} en promedio.

En Mesoamérica, región inicialmente libre de enemigos naturales, el cacao prosperó y formó la base de la industria moderna del chocolate (Evans, 2002). Actualmente el cacao es un producto altamente apreciado, y el chocolate es probablemente el más accesible de todos los lujos palatables del hombre. Además, cuando se cultiva de manera tradicional, el cacao ofrece beneficios sostenibles, no solo a los campesinos sino también al ambiente (Evans, 2002). No obstante, esta sustentabilidad está bajo amenazas crecientes por enfermedades que han coevolucionado con el cultivo. Algunas de ellas constituidas por enfermedades de nuevo encuentro, las cuales

ahora constituyen la más seria restricción para la producción del cacao (Gotsch, 1997; citado por Torres, 2010).

Durante los últimos años, se ha querido aumentar la productividad de los cultivos; para ello se ha hecho uso del mejoramiento genético de fertilizantes y principalmente de fungicidas e insecticidas, ya que se calcula que alrededor del 30 % de la producción mundial se pierde a causa de plagas y enfermedades. Históricamente, la producción mundial de cacao se ha caracterizado por periodos de contracción, seguidos por periodos de estabilización y luego de rápida expansión. Sin embargo, dentro de estas tendencias ha habido factores que han equilibrado en cierto modo el panorama general del suministro. Por ejemplo, mientras el nivel productivo descendía en determinadas regiones de cultivo tradicional, como Brasil, Ghana, Nigeria y Camerún, debido principalmente a una combinación de condiciones económicas desfavorables y de enfermedades del cacao, había una fuerte expansión en otros países, como Costa de Marfil e Indonesia. (Centro de Comercio Internacional CCI.; Conferencia de Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo UNCTAD, 2001).

Desafortunadamente, el cultivo de cacao en América Latina atraviesa por un grave problema causado por la diseminación de enfermedades, tales como escoba de bruja y la moniliasis, las cuales registran pérdidas en diferentes sentidos, con altos costos económicos, sociales y ambientales. La moniliasis causa pérdidas que alcanzan el 90 % de la producción, su alta agresividad afecta negativamente la rentabilidad del cultivo al depender en gran parte del manejo de fungicidas, del material genético y del manejo agronómico y cultural. Los métodos de control químico son de baja efectividad y poco económicos. Por su rápida dispersión se ha llegado a la conclusión que factores como el viento, insectos, mamíferos, aves y además del factor humano han jugado un papel importante en el desplazamiento de este hongo en la mayor parte de las regiones productoras de cacao en el mundo (Avendaño *et al.*, 2011).

2.2 El cultivo de cacao en México

El cacao, como cultivo es nativo de México, siendo la materia prima para la producción de un sinnúmero de productos, principalmente para el chocolate, por lo que el total de la producción se comercializa hasta llegar a plantas que industrialicen y transformen en producto terminado, principalmente chocolate (Ocampo *et al.*, 2012). Es uno de los cultivos alimenticios que desde el punto de vista tecnológico e industrial ha tenido un avance más lento. Quizás una de las razones se debe a su carácter altamente minifundista y las características de incompatibilidad genética que lo caracterizan (Batista, 2009).

Las personas que se dedican al cultivo de cacao son principalmente familias de los estados de Chiapas y Tabasco, debido a que estos estados por su clima y condiciones de tierra son los que aportan en mayor cantidad éste recurso para México. Además representa una magnífica oportunidad para implementar alternativas de desarrollo en el trópico, ya que estas plantaciones pueden albergar altos niveles de diversidad biológica, sobre todo si se compara con otros cultivos tropicales. Los cacaotales son muy adecuados para reforestar áreas completamente taladas, permitiendo la repoblación de aves, mamíferos, reptiles, anfibios, entre otras especies.

Desde el punto de vista ecológico (Ramírez, 2013) menciona que el cacao está situado principalmente en tres regiones que alimentan los principales ríos que abastecen de agua tanto para consumo como para generación de energía mediante hidroeléctricas. Además, se tiene el reporte de la existencia de una gran biodiversidad existente en las plantaciones de cacao, algunas de ellas plantadas bajo selva y otros con diversidad de árboles para que les generen sombra. Esto hace que el cultivo de cacao tenga una gran repercusión en el ciclo hidrológico, en la conservación de la biodiversidad regional, en la captura de carbono y la regulación de ciclos biológicos de diversas especies.

De acuerdo con Díaz *et al.* (2013), el cacao es uno de los recursos agrícolas y culturales más importantes del trópico húmedo mexicano. Actualmente, el sistema cacao enfrenta una crisis productiva sin precedentes debido a varios factores, entre ellos: la presencia de moniliasis (*Moniliophthora roreri*), abandono de plantaciones y baja rentabilidad en las fincas, los bajos precios por la cosecha, la ausencia de un valor agregado que permita tener ganancias adicionales a los campesinos, así como el desconocimiento y las desventajas para competir en el mercado internacional.

La migración de jóvenes hacia las grandes ciudades y hacia los Estados Unidos es el principal factor del abandono de las plantaciones. Ogata (2007) menciona que en el pasado ciclo, en varias zonas de Tabasco fue común observar que la edad de la mayor parte de las personas relacionadas con la cosecha de cacao oscilaba alrededor de los 50 años.

Ramírez (2013) afirma que en los dos principales estados productores de cacao, las densidades de las plantaciones son bajas (600 árboles/ha), utilizan materiales genéticos de baja calidad, realizan usualmente un inadecuado manejo de las mismas, con plantas que van de los seis a los siete metros de altura, existe un alto número de plantaciones viejas con más de 30 años y algunas de ellas ya están abandonadas. Por lo tanto, la calidad del grano de cacao se reduce, causando una gran disminución de ventas en empresas mexicanas, esto por falta de tecnificación y capacitación a los productores (Ocampo *et al.*, 2012).

Desafortunadamente con el ingreso a México de la enfermedad fungosa llamada moniliasis, los productores de cacao han tenido grandes pérdidas económicas pese a la alta calidad de su producto, está siendo desplazado por variedades más resistentes a las enfermedades y plagas. A pesar de que a este cultivo le ataca un sinnúmero de enfermedades causando daños y perjuicios a los agricultores, la moniliasis es la más peligrosa y destructiva del cacao, ya que su ataque provoca pérdidas de hasta 100 % en la producción.

2.3 Moniliasis (*Moniliophthora roreri*)

2.3.1 Origen y distribución

La moniliasis es una de las enfermedades más destructivas del cacao restringida a 11 países latinoamericanos, siendo uno de los principales factores limitantes causando pérdidas mayores al 30%, pero en muchas localidades alcanzan el 100 %. Sus efectos devastadores han causado el abandono de miles de hectáreas durante un periodo de casi 200 años según lo informa Phillips (2006). Esta enfermedad es producida por el hongo *M. roreri*, el cual causa la pudrición de las mazorcas de cacao. Es también conocida con los nombres de “pringue”, “hielo”, “enfermedad palúdica”, “helada”, “pudrición acuosa” y “enfermedad de Quevedo”, dependiendo del país y de la región donde se presenta (López *et al.*, 2006; PROAMAZONÍA, 2003).

Ecuador fue considerado inicialmente como el probable centro de origen de la moniliasis del cacao. Sin embargo, Phillips (2003) mediante estudios de genética poblacional y el uso de marcadores moleculares, demostró que la región geográfica del noreste de Colombia contiene la mayor diversidad genética que supera a la encontrada en Ecuador, por lo que se ubica a esta área como el centro de origen más probable.

La distribución de *M. roreri* comenzó en Colombia en 1817 (Phillips, 2003), Ecuador en 1917 (Rorer, 1918), Venezuela en 1941 (Muller, 1941) y Perú en 1950 (McLauhghlin, 1950). La aparición de *M. roreri* en Panamá en 1956 (Orellana, 1956) marcó una significativa expansión del rango del hongo y este ha sido dispersado a través de Mesoamérica. Durante los últimos 50 años *M. roreri* se dispersó más de 2500 km abarcando seis países: Costa Rica en 1978 (Enríquez y Suárez, 1978), Nicaragua en 1980 (López y Enríquez, 1980), Honduras en 1997 (Porrás y Enríquez, 1998), Guatemala en el 2002 (Phillips y Wikilson, 2007), Belice en el 2004 (Phillips *et al.*, 2006) y México en el 2005 (López *et al.*, 2006), alcanzando así el límite norte del cultivo de cacao en el Continente Americano (Figura 1). Es de hacer notar que en México la dispersión se dio en un salto de aproximadamente 400 km aproximados, a la posición más al norte que se conoce. La forma en que se dispersó el hongo hacia México, y al interior del territorio mexicano, sustenta la teoría de que este evento fue mediado por el hombre.

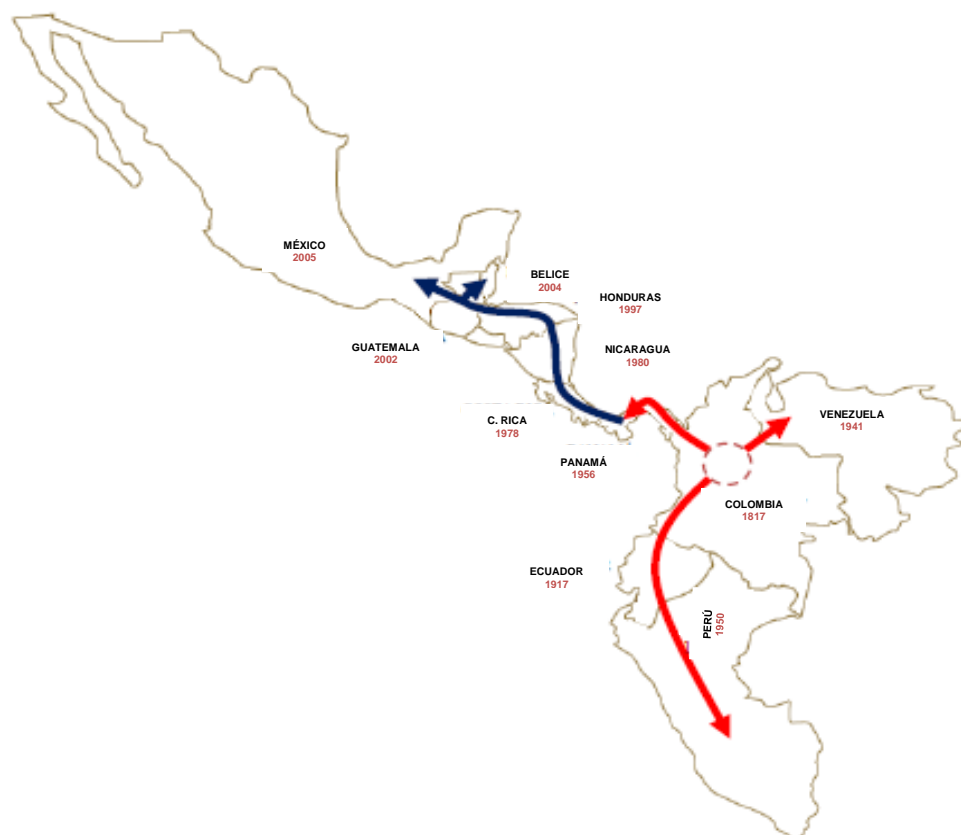


Figura 1. Probable diseminación de la moniliasis del cacao en América.
Fuente: Torres (2010).

2.3.2 Importancia económica

En una plantación de cacao desatendida, técnicamente la moniliasis puede destruir hasta 95 de cada 100 frutos, lo que hace antieconómico el cultivo aun en épocas de buenos precios en el mercado. Por el contrario, cuando se realizan prácticas de manejo en el cacaotal como control de malezas, podas a los árboles de cacao, regulación de sombra, remoción frecuente de frutos enfermos y mejora los drenajes, las pérdidas en la producción pueden reducirse a menos del 8 %, resultando rentable la explotación del cultivo. Para tener estos bajos niveles de incidencia de la enfermedad, es necesario no desatender las otras labores agrícolas como eliminación de chupones, el despunte de ramas y eliminación de aquellas ramas entrecruzadas, cosechas frecuentes de frutos sanos y enfermos y finalmente la fertilización (FHIA, 2003).

En Venezuela, Meza y León (1972) señalan pérdidas entre el 40 y 50 % de la producción por su daño. En Colombia, Barros (1980) señala que las pérdidas por la enfermedad están alrededor del 40 %, por otro lado en Ecuador, Ampuero (1967) señala que las pérdidas estimadas van desde el 15 hasta el 80 %.

En el caso de México, la voz de alerta sobre la presencia de la moniliasis del cacao se dio en marzo de 2005 por funcionarios de la Universidad Autónoma de Chiapas, este primer reporte fue en el municipio de Pichucalco, Ranchería Zaragoza, del estado de Chiapas. A partir de esa localidad se empezó a diseminar a municipios cercanos, llegando hasta plantaciones del estado de Tabasco. A finales del año 2006, se detectó en el municipio de Tuzantán, en mayo del 2007 se reporta ya en plantaciones de Huehuetán, pertenecientes al Soconusco, otra de las regiones de mayor producción de cacao del estado de Chiapas y poseedores del legendario cacao criollo del Soconusco. Desafortunadamente no se tienen reportes oficiales del efecto de la moniliasis tanto en área como en producción y número de productores afectados (Ramírez, 2008).

En un contexto mundial, las pérdidas causadas por *M. roreri* son proporcionalmente pequeñas comparadas con los daños globales de *Phytophthora* spp (con mayor distribución regional); sin embargo, la diseminación de la moniliasis a otras latitudes podría tener efectos superiores para la actividad cacaotera mundial (Phillips, 2004).

2.3.3 Etiología

Moniliophthora roreri se caracteriza por ser un hongo mitosporico de los Agaricales (Correa *et al.*, 2014; Phillips, 2003 citado por Moreira, 2006). Posee micelio septado con doliporos típicos (Figura 2), las esporas se producen en cadenas con maduración basipétala (Correa *et al.*, 2014; Evans *et al.*, 1978; Evans, 1981), y se desprenden fácilmente del micelio; su pared es gruesa y amarilla-pálido o café cuando forman masas de esporas.

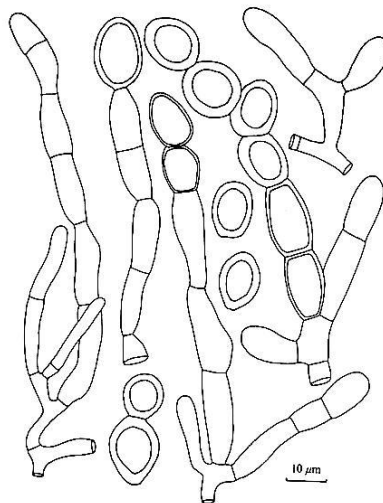


Figura 2. Estructuras morfológicas de *M. roreri* mostrando micelio septado y esporas de pared gruesa. Fuente: Evans *et al.* (1981).

Por estudios citológicos se observó que las conidias han sido postuladas a servir como meiosporas; lo que sugiere que estas esporas representan un basidium modificado que perdió la forma, espesor y carnosidad del basidiocarpio, formando solo un pileus vestigial. Las esporas son multifuncionales y sirven no solo para el intercambio genético sino también para la dispersión, infección y sobrevivencia (Evans, 2007).

La geometría de las esporas varía de esféricas a ovaladas y presentan dos casos de germinación, ya sea por medio del poro germinativo o en ocasiones directamente desde la pared celular (Evans *et al.*, 2003). El tubo germinativo se localiza en el extremo distal y se pueden encontrar estructuras similares a un apresorio. Las esporas de mayor edad se caracterizan por sus paredes con mayor grosor y tonalidades oscuras, las cuales dan inicio a la fase de dormancia (Evans, 1980).

Thévenin y Trocmé 1996 señalan que *M. royeri* se considera un hongo hemibiótrofo, dado que su ciclo pasa por dos fases: una fase biotrófica, que va desde la germinación de las esporas hasta la invasión intercelular de la epidermis de las mazorcas; y una fase necrótica cuando el crecimiento de la mazorca disminuye y el hongo invade las células provocando la aparición de necrosis interna y externa.

2.3.4 Sintomatología

En condiciones de campo, *M. royeri* ataca únicamente al fruto en cualquier estado de desarrollo (Evans, 1981; López *et al.*, 2006; Suárez y Rangel 2014; Villamil *et al.*, 2012), pudiendo encontrar síntomas externos e internos (Sánchez y Gárces 2012; Phillips, 2006). La infección ocurre en las primeras etapas de crecimiento del fruto y conforme van creciendo, las mazorcas se vuelven más resistentes (Enríquez, 2004). Una vez que el fruto es infectado por el hongo, puede tardar de 40 a 60 días para manifestar los daños externos. La susceptibilidad de los frutos es inversamente proporcional a su edad; es decir, que a mayor edad menor susceptibilidad (Jaimes y Aranzazu, 2010).

Ramírez (2013) señala que la infección en frutos menores de dos meses y medio de edad, su crecimiento continúa aparentemente normal y luego desarrolla protuberancias o tumefacciones de los tejidos del exocarpo, con una coloración más clara y brillante que el resto de la mazorca, después del desarrollo de las protuberancias ocurre la muerte del chilillo.

Cuando los frutos infectados han completado la mitad o más de su desarrollo, el síntoma más característico es una mancha color marrón oscuro y con borde irregular, denominada “mancha chocolate” (López *et al.*, 2006; Phillips, 2004), que se manifiesta inicialmente en forma de pequeñas manchas aceitosas. Estas manchas,

crecen rápidamente hasta tornarse de color café oscuro, frecuentemente rodeadas de un halo amarillento y pueden llegar a cubrir totalmente la mazorca, dando la apariencia de una pudrición; otro síntoma es la maduración prematura de las mazorcas afectadas, que se manifiesta por una coloración amarillenta de distribución irregular (López *et al.*, 2006; Phillips, 2003).

El daño interno causado por la enfermedad puede ser más grave que el externo, pudiendo llegar a perderse casi todas las almendras, sin importar la edad del fruto (FHIA, 2003). Estos síntomas se observan al partir la mazorca (López *et al.*, 2006), los tejidos centrales, pulpa, semillas y algunas veces la cáscara forman una sola masa en donde los tejidos son rodeados por una sustancia acuosa debido a la descomposición de ellos, que produce un olor fermentado siendo también las almendras destruidas parcial o completamente, dependiendo del tiempo de infestación de los frutos (IICA, 2006; Phillips, 2006). Cuatro o cinco días después de que la mazorca ha sido completamente invadida, aparece sobre las manchas un polvillo fino, de color gris como ceniza, que constituyen las esporas o semillas del hongo. Este polvo puede ser diseminado a otra mazorca por el viento, el agua, las aves, los roedores, los insectos y el hombre, y producir nuevas infecciones. (PROAMAZONÍA, 2003; López *et al.*, 2006).

Los frutos infectados después de los tres meses de edad pueden mostrar necrosis de color marrón, que afecta a alguna a todas las semillas. Un síntoma externo que se presenta con poca frecuencia es el agrietamiento de la mazorca infectada y pueden tomar mayor peso (Arévalo *et al.*, 2004; López *et al.*, 2006), aun cuando tengan tamaño similar. En frutos infectados de cuatro meses de edad, la infección puede limitarse al mesocarpo sin afectar las semillas, o bien, solo alcanzar algunos granos (Desroiser y Suárez, 1974; Phillips, 2004).

2.3.5 Ciclo de vida de *Moniliophthora roreri*

Diversas investigaciones han permitido conocer a detalle el ciclo de la enfermedad e identificar otros síntomas atípicos (Arguello, 2000; Barros, 1980; González, 1982; Jaimes y Aránzazu, 2010; Merchán, 1980). A partir de estos estudios se conoce que en condiciones de campo solo son afectados los frutos y que los síntomas dependen del grado de desarrollo que tenga la mazorca (López *et al.*, 2014).

Según (Galindo y Enríquez, 1984; citado por Ramírez, 2013) la fuente de inóculo conocida capaz de producir infecciones son los conidios. El origen de estos para generar una nueva infección define dos ciclos de vida del hongo: primario y secundario. En el primer caso, el inóculo llega a una mazorca sana procedente de un fruto con infección reciente sobre el cual se ha desarrollado un estroma esporulante.

En el segundo caso, las esporas proceden de frutos infectados y momificados en ciclos anteriores que permanecen en el árbol durante mucho tiempo (Figura 3).

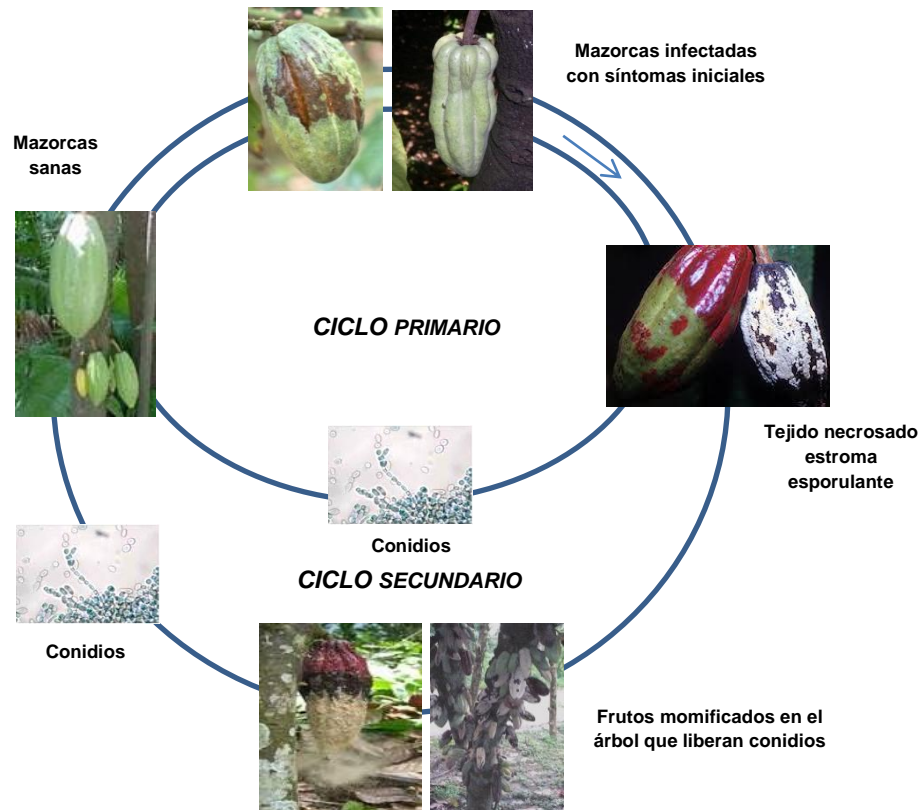


Figura 3. Ciclo de vida del hongo *Moniliophthora roreri*. Fuente: López *et al.* (2006).

El ciclo comienza con la penetración del hongo en el fruto, este proceso es llevado a cabo por el tubo germinativo de las conidias, que son el único propágulo infectivo, directamente a través de la epidermis o por vía estomatal (Evans, 2002, citado por Ochoa, 2014) sin que sea necesaria la presencia de heridas. Suárez (1980) menciona que la penetración se realiza mediante uno a cinco tubos germinativos que se extienden sobre la epidermis y producen las hifas de infección.

López *et al.* (2014) mencionan que los frutos infectados menores de dos meses y medio continúan su crecimiento aparentemente normal pero luego desarrollan deformaciones en forma de protuberancias de los tejidos del exocarpo, con una coloración más clara y brillante que el resto de la mazorca. Después del desarrollo de las protuberancias ocurre la muerte del fruto o chilillo. Cuando la enfermedad ha completado la mitad o más de su desarrollo, el síntoma más característico es una mancha marrón oscuro y con borde irregular que se denomina “mancha chocolate” y que se manifiesta inicialmente en forma de pequeñas manchas aceitosas. Éstas crecen rápidamente hasta tornar su color en café oscuro y pueden llegar a cubrir totalmente la mazorca y dar la apariencia de pudrición. Aproximadamente de 3 a 8

días después del inicio de la mancha chocolate o lesión necrótica se desarrolla un crecimiento micelial de color blanco a crema sobre los tejidos afectados. Esto conlleva a la muerte del fruto, para luego cubrirse de una “felpa” de color crema, que son las esporas del hongo (Sánchez y Garcés, 2012).

2.3.6 Epidemiología

No se ha determinado experimentalmente el papel exacto que juega la lluvia, la humedad relativa y la temperatura en el desarrollo de la enfermedad. Se ha observado que las lluvias intensas y frecuentes, una humedad relativa alta y un ambiente húmedo en la plantación, proporcionado por sombra excesiva y poca aireación, favorecen la frecuencia e intensidad del ataque (Barros, 1977; citado por Sánchez, 2011). Las infecciones causadas por *Moniliophthora roreri* se favorecen por varios factores como la temperatura, entre 25 y 30 °C y la humedad relativa mayor a 80 %, estos factores determinan altas tasas de infección con carácter de epidemia durante las fases de floración y fructificación del árbol (Evans, 1981).

Algunos estudios han establecido una correlación positiva entre la cantidad de lluvia y la cosecha de mazorcas enfermas tres a cuatro meses después, lo que concuerda con relación al tiempo que tarda la expresión de los síntomas. Un fruto infectado es capaz de producir entre seis y siete billones de conidias durante veinte periodos de esporulación en 80 días (Desrosiers *et al.*, 1955).

Meléndez (1993) encontró que existe una estrecha relación entre la humedad relativa y el movimiento de esporas del hongo, indicando que la liberación es realizada entre el 71 y 74 % de humedad relativa entre las diez de la mañana hasta las dos de la tarde aproximadamente.

Según Porras y Enríquez (1998), aparte de los seres humanos, fuertes vientos y hasta huracanes pueden ser posibles agentes de diseminación a largas distancias. Los insectos, aunque pueden trasladar estructuras infectivas de un lugar a otro, no son necesarios como vectores de la enfermedad ya que las hifas del hongo tienen la capacidad de atravesar la epidermis de las mazorcas (Suárez, 1971; citado por Leandro, 2011). Así también, Phillips, (2003) menciona que diferentes especies de animales han jugado un papel importante en la dispersión de *M. roreri*. De esta forma es probable que el patógeno se haya dispersado a diferentes regiones cacaoteras, superando barreras geográficas naturales. En otros materiales, como costales, herramientas de trabajo, es posible que se transporten esporas, las cuales podrían producir infecciones en caso de llegar a frutos en condiciones ambientales favorables.

Sobre las plantaciones afectadas, existe una presencia permanente de esporas de *M. rozeri*, flotando en el aire, por lo que la infección de los frutos puede ocurrir en cualquier momento mientras exista tejido susceptible y condiciones ambientales favorables como el drenaje deficiente del suelo, plantas muy altas y con exceso de sombra y sin la ejecución de labores culturales, especialmente la poda, la regulación de la sombra y el manejo de arvenses. Por otro lado, López *et al.*, (2006) mencionan que el patógeno se mantiene en los frutos infectados que se encuentran adheridos a las plantas, los cuales mayormente están ubicados en parcelas abandonadas o sin manejo. Los frutos momificados que no son removidos de los árboles representan la mayor fuente de inóculo del hongo, el cual produce varios ciclos de esporulación, hasta por periodos de más de nueve meses (Ampuero, 1967). La presencia de agua libre no solo permite la germinación de las esporas, sino que remueve el inóculo desde estos frutos. En frutos caídos al suelo o colocados debajo de la hojarasca, el patógeno sobrevive menos tiempo, debido a que el fruto es atacado por diversos microorganismos, que promueven su descomposición. Además, algunos microorganismos presentes en el suelo pueden ejercer efectos negativos al patógeno (López *et al.*, 2006).

2.3.7 Métodos de control de la moniliasis

En plantaciones localizadas en regiones con alta humedad y sin manejo adecuado, es frecuente observar pérdidas superiores al 90 % de la cosecha. No obstante, con prácticas óptimas de manejo los daños se reducen de forma significativa (Fondo Nacional del Cacao, 2011). Existen diversas técnicas de manejo que permiten realizar un control parcial de la enfermedad. Todas tienen como objetivo eliminar por completo el inóculo del patógeno; sin embargo, solo llevan a reducir los daños. Los métodos usados varían solo en el proceso y la herramienta base, otorgando un nombre según el modo de aplicación (Schnell *et al.*, 2005 citado por Correa *et al.*, 2014).

El control de la moniliasis se basa en un sistema de manejo integrado, el cual incluye la siembra de materiales genéticos de alta productividad con tolerancia a la enfermedad (Arguello, 1990; Phillips, 2003; López *et al.*, 2006), la implementación permanente de prácticas culturales (Cubillos y Aranzazu, 1979; Mejía y Argüello, 2000; López *et al.*, 2006), el control químico (Mejía y Argüello, 2000; FHIA *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2003; López *et al.*, 2006) y el control biológico.

Las prácticas culturales y del manejo del cultivo permiten la manipulación del medio ambiente para generar condiciones menos favorables al desarrollo de la enfermedad; estas condiciones se logran mediante una modificación de prácticas regulares del agricultor. Este es el método más importante para reducir la tasa de incremento de

M. roleri y las pérdidas de la cosecha, logrando alta productividad. (Jaimes y Aranzazu, 2010).

En el manejo cultural se han incluido prácticas como: la eliminación semanal de frutos con los síntomas iniciales de la enfermedad, en las distintas etapas de desarrollo del fruto. Sin embargo, es recomendable recoger los frutos antes de la esporulación del hongo, para evitar la dispersión de sus esporas, así como también embolsar los frutos y retirarlos a cualquier hora del día. (González *et al.*, 1983; Bateman *et al.*; 2005; López *et al.*, 2006). En la época de mayor floración, la remoción de frutos enfermos debe realizarse cada semana, ya que es cuando hay mayor producción de frutos y la mayoría de ellos son jóvenes y presentan más susceptibilidad a la enfermedad; además, coincide con la época de lluvias, que provee condiciones óptimas para el desarrollo de la enfermedad (López *et al.*, 2006); poda sanitaria del árbol de cacao (eliminación de renuevos) reducción de la altura de la planta de tres o cuatro metros para mejorar su arquitectura, facilitar la aireación, favorecer la entrada de luz, y la reducción de la humedad en la plantación. La poda implica la eliminación de ramas afectadas por plagas, enfermedades y aquellas que no permiten una buena arquitectura de la planta y sanidad del cultivo, ya que en las plantaciones adultas los árboles de cacao generalmente alcanzan alturas que van de seis a siete metros, lo cual hace difícil el manejo sanitario.

La poda frecuente, regulación del estrato superior, buen drenaje, densidades apropiadas, buen control de malezas y correcto programa de fertilización, ayudan al óptimo desarrollo del árbol de cacao, pues hace que los patógenos que ingresen a las plantaciones tengan pocas probabilidades de establecerse y posteriormente desarrollarse; con un manejo cultural adecuado estas pueden ser controladas económicamente y se podrá convivir con la enfermedad y si la enfermedad ya está presente, es de suma importancia remover de la plantación, semanalmente las partes afectadas del cacaotal, reduciendo la intensidad de la mencionada molestia. (Phillips, 2004; Johnson *et al.*, 2008; Ramírez, 2008; López *et al.*, 2006; Ramírez, 2013).

Como resultado de experimentos realizados en el estado de Tabasco en México, en los cuales se evaluaron prácticas de manejo integrado de la enfermedad y niveles de sombreado, sugieren realizar las siguientes labores: remoción semanal de frutos enfermos, poda de ramas internas, reducción de la altura del árbol a 4 metros y eliminación total de frutos en periodos de baja producción, indicando además que el nivel de sombreado del 50 %, mostró los mejores resultados (Ochoa, 2014; citado por Torres *et al.*, 2011).

En estudios demuestran que la remoción semanal de mazorcas enfermas realizadas durante todo el año redujo la incidencia de moniliasis de un 26 a 41 % (Soberanis *et*

al., 1999). Sin embargo, estas prácticas fitosanitarias han mostrado inconsistencia debido a que la enfermedad persiste y avanza en forma preocupante en las zonas donde no se practica ningún control (Sandoval *et al.*, 1987). Además su aplicación es impracticable, porque los incrementos que se logran en la producción no alcanzan a cubrir los gastos que demanda la operación (Falconí *et al.*, 2005; Sandoval *et al.*, 1987 y Barros, 1980). Por lo tanto, es necesario aplicar diversos métodos de control suplementarios y económicamente viables.

De acuerdo con Phillips (2004), el combate de *M. royeri* mediante resistencia genética resulta el método más barato, sencillo, duradero y eficaz. En este sentido, Phillips *et al.*, (2005) han identificado una fuente destacada de resistencia en el clon ICS-95 con un significativo nivel de resistencia contra aislamientos de *M. royeri*. En base a lo anterior, el uso de resistencia genética de *M. royeri* es factible. Sin embargo, el progreso en la investigación de resistencia no se ha visto reflejado en el combate exitoso de la enfermedad, posiblemente debido a que esta estrategia de manejo generalmente no integra simultáneamente otros métodos de control complementarios. Aunque el uso de clones con resistencia genética representa una importante alternativa como método de control de *M. royeri*, este tiende a reducir la diversidad genética; por lo que puede afectar los sistemas tradicionales de producción sostenibles, y hacer al cultivo más vulnerable a plagas, cambios ambientales, e incrementar la dependencia a los insumos externos (Gliessman, 2002).

En cuanto a la búsqueda de material resistente a *M. royeri*, Sánchez (1982) menciona que se inició desde que se detectó la enfermedad. Desde hace algunos años en Ecuador, Colombia y Costa Rica, se han realizado observaciones de la infección natural de diversos árboles y con inoculaciones artificiales, estas evaluaciones han permitido seleccionar algunos clones con cierto nivel de resistencia. En Costa Rica (1982) se desarrolló un método de inoculación artificial de frutos en el árbol con una suspensión de esporas, que le permitió detectar diferencias en la susceptibilidad entre clones. Aplicando la misma técnica, Brenes (1983), encontró algunos clones que fueron clasificados como resistentes; y en Colombia, Arguello (2000) reporta la presencia de diversos clones con resistencia a la enfermedad.

Sin embargo, aún se desconocen resultados concluyentes de las evaluaciones de los clones y sus descendencias bajo los diferentes ambientes en donde la enfermedad está presente. Además, aun es necesario estudiar si esta resistencia es heredable, así como el mecanismo de transmisión de los clones a las descendencias híbridas, y por otra parte, si estas resultan de buen rendimiento y calidad organoléptica.

El control biológico implica el empleo de organismos vivos o virus que regulan la incidencia de insectos plaga o patógenos. En los últimos cien años se ha visto un

rápido incremento en su conocimiento y empleo, lo que ha permitido manipularlos como parte de un sistema efectivo y seguro para el manejo de plagas o enfermedades (Peshin y Dhawan, 2009; citado por Jaimes y Aranzazu, 2010).

Krauss y Soberanis (2001) citado por Torres (2010) reportaron el uso efectivo del control biológico mediante mezclas de microparásitos para el control de *M. roreri* con la combinación de cinco aislamientos de *Clonostachis rosea* con incremento en la producción. Por su naturaleza, el control biológico no elimina, sino que reduce las poblaciones de patógenos y como consecuencia, reduce la incidencia de la enfermedad; por lo tanto, ese tipo de control debe emplearse de manera integrada con otros métodos de control.

En la actualidad, el control biológico enfatiza en la conservación de los enemigos naturales, los cuales se encuentren en los ecosistemas naturales, generando un equilibrio entre las poblaciones de organismos presentes enfermedades (Peshin y Dhawan, 2009; citado por Jaimes y Aranzazu, 2010). Estos organismos son de gran interés por su potencial como agentes de control biológico y por su adaptabilidad a los diversos factores bióticos y abióticos de un agroecosistema. Esto se debe a que los enemigos naturales han coevolucionado en el sistema, proveyendo por si mismos un significativo nivel de control de las poblaciones de patógenos.

En Perú, por ejemplo, se obtuvieron resultados promisorios utilizando una combinación de *Trichoderma* sp., *Clonostachys rosea* y *C. byssicola* para controlar *M. roreri* (Krauss *et al.*, 2003). En Colombia se reportan inhibiciones hasta de 95 % en el crecimiento en condiciones de Laboratorio de *M. roreri* con diferentes cepas controladoras de crecimiento como *Trichoderma* sp (Suárez, 2006) y de 89 % con *Bacillus brevis* (Suárez y Rangel, 2013).

Por otro lado Corpoica ha adelantado ensayos de evaluación de microorganismos nativos con efecto potencial de biocontrol, en condiciones *in vitro*. Aunque en ensayos preliminares solo una cepa de *Clonostachys* sp., mostró un efecto de biocontrol en condiciones de campo, es necesario seguir evaluando otros microorganismos, ya que según los reportes de Phillips *et al.*, (2007) en Colombia se encuentra el mayor número de agentes de biocontrol, sugeridos por coevolución, por ser el centro de origen de *M. roreri*. En Venezuela, identificaron la microbiota en plantas de cacao, donde estudiaron muestras de hojas, encontrando en ellas una población epífita de cacao muy abundante, siendo 48 especies de hongos, de los cuales, fueron detectados, *Penicillium* sp y *Gliocladium* sp., como posibles controladores biológicos. (Urdaneta y Delgado, 2007; citados por Sánchez y Garcés, 2012).

Estudios realizados en Costa Rica por Krauss *et al.* (2003), evaluaron un manejo integrado de la moniliasis. Se recomendó la combinación de control biológico con tres aplicaciones mensuales comenzando en la época de floración, seguido por la remoción fitosanitaria quincenal de mazorcas enfermas. Además, cuatro tratamientos biológicos redujeron la moniliasis con incrementos de rendimiento hasta el 50 %. Recientes estudios realizados por Bateman *et al.* (2005), analizan la aplicación de químicos y agentes biológicos para el control de moniliasis, determinando una interacción entre estos agentes y los métodos de aplicación. En estos ensayos, el uso de *Clonostachys byssicola*, *Trichoderma asperellum* y dos fungicidas no mejoraron significativamente en la producción.

En experimentos realizados en varios países, se ha determinado que el combate químico de la moniliasis del cacao es usualmente antieconómico y en muchos casos ineficaz (Desrosiers y Suárez, 1974; Suárez, 1982; González *et al.*, 1983). Sin embargo, esta apreciación puede ser incorrecta tomando en cuenta que algunos experimentos han sido realizados en sistemas con baja productividad o cuando los precios del cacao son bajos. De acuerdo a López *et al.*, (2006), las aspersiones de fungicidas para el control de la moniliasis han sido ensayadas en diversos lugares; sin embargo, las investigaciones realizadas para el combate químico con una gran cantidad de productos evaluados, no son del todo satisfactorios. En la mayoría de los casos se cuestiona su efectividad, además de resultar costosos. Los mejores resultados obtenidos en el control químico de la moniliasis del cacao, en condiciones de campo, han sido a través de la aplicación de clorothalonil (Daconil-500) (González *et al.*, 1983); óxido cuproso (Murillo y González, 1984); hidróxido de cobre (Hidalgo *et al.*, 2003) y flutolanil (Bateman *et al.*, 2005).

En Ecuador, se realizaron 13 ensayos con diferentes productos químicos y los resultados obtenidos muestran efectos variables de los fungicidas sobre la incidencia de la enfermedad y a menudo resultan contradictorios. En Colombia, para el control de la moniliasis tradicionalmente se han empleado productos protectantes con una eficacia limitada. No obstante, se han venido enriqueciendo con el sulfato de cobre en dosis de 2 kg ha^{-1} y protectantes orgánicos, lo que muestra una reducción en la incidencia de la enfermedad (Jaimes y Aranzazu, 2010), estos productos deben ser aplicados en cultivos con alta densidad, semanalmente, durante tres meses, e iniciando en los picos más altos de la floración según lo mencionan Crespo del Campo y Crespo, 1997). En Venezuela (Meza y León, 1972; Sánchez *et al.*, 2003) mencionan que el oxiclورو de cobre en dosis de 2.5 kg ha^{-1} , aplicado cada tres semanas durante la estación lluviosa, realiza un combate efectivo del patógeno.

En México, Ramírez (2013) reporta a Quevedo (2012) quien evaluó la efectividad *in vitro* de diferentes fungicidas a diferentes concentraciones de 250, 500 y 1000 mg L^{-1} sobre el desarrollo micelial y la germinación conidial de *M. royeri*, seleccionando los

de alta efectividad para realizar pruebas en campo. Los productos químicos fueron azoxystrobin, tebuconazol, trifloxystrobin, propiconazol, tiabendazol, (sistémicos) y clorotalonil (contacto). Los fungicidas tebuconazol, trifloxystrobin, propiconazol inhibieron el 100 % la germinación y el desarrollo micelial en las concentraciones evaluadas, el azoxystrobin inhibió el 100 % de la germinación de conidios a partir de 500 mg L⁻¹; sin embargo, solo alcanzó el 80 % en la inhibición del desarrollo micelial. Estos fungicidas fueron seleccionados para la prueba en condiciones de campo a 400 y 800 mg L⁻¹. Cabe destacar que azoxystrobin, tebuconazol, trifloxystrobin a 800 mg L⁻¹, mostraron la mayor efectividad (65 al 70 %) sin haber diferencias significativas entre ellos, sin embargo el valor más alto fue obtenido por el azoxystrobin.

Flood y Murphy, (2004) mencionan que para el control químico de *M. royeri* se emplean tradicionalmente fungicidas protectantes, aunque con cuestionable eficacia. Sin embargo, el uso de cobre y protectantes orgánicos ha mostrado reducir la incidencia de la enfermedad. Aunque los sistemas de aplicación mejorados con fungicidas sistémicos pueden mejorar la eficacia en el control de *M. royeri*, pero con una baja adopción por el incremento en los costos de producción. Varios autores han comprobado que el control de la enfermedad con fungicidas generalmente ha sido poco satisfactorio en el cacao. Los fungicidas protectantes tienen que ser aplicados frecuentemente por la rápida expansión de la superficie de la mazorca durante los primeros dos a tres meses del desarrollo del cultivo (Soberanis *et al.*, 1999).

Suárez (1982) y Falconí *et al.* (2005) coinciden que el tratamiento con productos químicos, no solo es inapropiado y en algunos casos ineficaz debido a la falta de total cobertura, ya que la mayor cantidad de frutos se encuentran concentrados en el tronco y las ramas bajas del árbol, sino que además, los fungicidas no poseen una buena adherencia y son lavados rápidamente por las fuertes lluvias. Además, el uso de fungicidas es demasiado costoso para ser considerado en un plan de manejo ya que se necesita un número excesivo de aplicaciones para lograr una gran cobertura adecuada de las mazorcas (Jiménez *et al.*, 1987 y Purdy, 1999).

2.4 Tecnologías generadas para el manejo orgánico de *Moniliophthora royeri*

La producción y comercialización de productos orgánicos han experimentado un crecimiento exponencial a nivel mundial durante la última década del siglo XX. Esta situación ha sido fomentada principalmente por tres aspectos: crecimiento de la oferta y la demanda, sobrepago por los productos orgánicos en los países industrializados y desarrollo de diferentes sistemas regulatorios. El crecimiento de la demanda se debe básicamente al cambio de la conciencia mundial sobre el deterioro del medio ambiente, la pérdida de biodiversidad, los problemas de salud y las injusticias sociales en los tradicionales sistemas de comercialización de productos

básicos (Hinojosa *et al.*, 2003). A pesar del incremento sostenido en la demanda de cacao orgánico, la oferta es insuficiente (The International Cocoa Organization, 2006; Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 2010), por lo cual es necesario desarrollar alternativas para el control de la moniliasis, aceptadas dentro de la normatividad de producción orgánica y que presenten una buena relación costo/beneficio para el productor (Ochoa *et al.*, 2015).

Existen productos que, dadas sus características de eficiencia pero de bajo o nulo impacto ambiental, son permitidos incluso en la producción orgánica certificada, tal es el caso de los productos elaborados a partir de minerales como el polisulfuro de calcio, mezclas de minerales con otros compuestos no sintéticos (preparados minerales) y extractos de plantas (Ochoa *et al.*, 2015; Ramírez *et al.*, 2011b).

Con respecto a los productos elaborados a partir de minerales, Ramírez *et al.*, (2011b) determinaron la efectividad del polisulfuro de calcio (PC) como alternativa para el manejo de la moniliasis del cacao. Los autores reportan que el polisulfuro de calcio inhibe *in vitro* el crecimiento y la formación de conidias de *M. royeri*. La aplicación de este producto, antes o después de la inoculación de conidios de *M. royeri* sobre frutos de cacao, inhibe por completo el desarrollo de la enfermedad. Las aspersiones del preparado en plantaciones de cacao redujeron la incidencia de la enfermedad al 0,53 %, frente a 21 % con manejo cultural y 69,6 % del testigo de inoculación natural, además, mejoró la producción de cacao seco/año en un 90,6 % en relación con el testigo de inoculación natural.

Ochoa *et al.* (2015) evaluaron en condiciones de laboratorio la actividad fúngica sobre *M. royeri* de preparados minerales como: caldo visosa (CV), caldo bordelés más permanganato de potasio (CBP), caldo bordelés más sulfato de zinc y sulfato de magnesio (CBS), caldo de bicarbonato de sodio (Bis), caldo silicosulfocálcico (SSC) y polisulfuro de calcio (PC). Los autores encontraron que los preparados de SSC y PC fueron los más eficaces inhibiendo 100 % de crecimiento micelial aun en concentraciones de 10 %. Por otro lado, la prueba en medio líquido mostró que a las 96 horas los preparados de SSC y PC fueron los más eficaces, llegando a reducir el número de esporas en 98.2 y 79.9 %.

En el manejo basado en la utilización de extractos vegetales, diversos investigadores han retomado los antiguos métodos de manejo de enfermedades como la utilización de extractos de vegetales, que en el marco de proyectos de manejo integrado permite una producción agrícola más sostenible y menos contaminante (Vergara, 1994; Villa, 1999).

México es uno de los países con mayor diversidad vegetal en el mundo, estimándose que tiene entre 23,000 y 30,000 especies de plantas (Toledo, 1994) de las cuales, se

utiliza una mínima cantidad (Sarukhan, 1995). Se presentan plantas endémicas en todos los tipos de climas que existen en la república y empíricamente se les ha dado a algunas una utilidad medicinal, en algunos casos contra problemas infecciosos de origen fúngico. Los plaguicidas naturales han sido usados en la agricultura como una alternativa para el manejo de problemas fitosanitarios, entre los cuales se destacan: fungicidas, fungistáticos, insecticidas, antialimentarios, inhibidores de crecimiento, hormonas juveniles de muda, deterrentes de la oviposición, atrayentes, repelentes y disuadores. Estos pueden constituirse en buenos modelos para el desarrollo de productos sintéticos análogos o ser usados como ingredientes activos si están disponibles en abundancia (Ayyangar y Nagasampagi, 1993; citados por Vergara, 1997a).

Según lo reporta Ramírez, (2013) la importancia de las plantas, se debe a que contienen principios activos en algunos de sus órganos, los cuales, extraídos de forma adecuada y administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos que permiten el manejo de microorganismos fitopatógenos y de insectos plaga en los cultivos. La misma autora, menciona que el estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre los seres vivos. Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (resinas, aceites esenciales, etc.). Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos, que pueden ser glucósidos, galactósidos, etc. Otros componentes activos de las plantas son alcaloides, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas. Los principios vegetales que ejercen acción farmacológica generalmente son producidos por la planta en su metabolismo secundario.

La planta es un sistema de diferentes rutas biosintéticas, cuya principal fuente de activación es la fotosíntesis que origina en las hojas los metabolitos primarios, y por procesos bioquímicos, con la ayuda de algunas enzimas, se obtienen unidades azucaradas según (Sanabria, 1983; Morales, 1997; citado por Viveros y Castaño (2006). A través de las rutas de obtención de los metabolitos primarios, y por procesos bioquímicos ayudados por enzimas, se generan metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides, flavonoides, terpenoides, quinonas, etc.), deben ser extraídos de la forma en que se presenten tratando de no alterar sus propiedades biológicas (Sanabria, 1983; citado por Viveros y Castaño, 2006). Por lo tanto los extractos de plantas constituyen una fuente natural importante de la búsqueda de nuevos compuestos con actividad fungistática de interés, cuya comprensión de sus procesos bioquímicos ha perfilado una nueva estrategia orientada al manejo de estas defensas químicas contra microorganismos.

Vivanco *et al.* (2005) mencionan que algunas plantas tienen metabolitos secundarios que son tóxicos, con función antibacteriana o antifúngica e inhiben la germinación de

esporas y, por tanto frenan el proceso infeccioso (Ward, 195; citado por Luna y Lara, 2007). Los metabolitos secundarios son compuestos o sustancias presentes en concentraciones variables, en los tejidos vegetales adultos, cuya función primordial parece ser la protección frente al ataque de herbívoros y defensa contra infecciones microbianas o virales, debido a que sirven de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta, e inhiben a la germinación de esporas. También funcionan como atrayentes de insectos polinizadores y agentes de competición planta-planta (Luna y Lara, 2007).

En los estados productores de cacao en México existe una gran diversidad de plantas que muestran ser efectivas en el manejo de enfermedades del cacao como mancha negra (*Phytophthora* spp), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), moniliasis (*Moniliophthora roreri*) (Ramírez y López, 2006; Ramírez, 2008b; Ramírez *et al.*, 2001a; Lozada *et al.*, 2012; Ramírez, 2013), estas son el orégano (*Origanum vulgare* L), maguey morado (*Tradescantia spathacea* Swartz) y jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe).

Origanum vulgare L es una planta aromática cultivada en varias regiones del mundo, cuyo valor comercial se debe a sus características como especia, condimento y propiedades medicinales. De mayor importancia industrial y farmacéutica es su aceite esencial, el cual se emplea como fragancia en jabones, perfumes, cosméticos, saborizantes, entre otros (Koksai *et al.*, 2010); además, posee propiedades antibacteriales, antifúngicas, antiparasitarias, antimicrobianas y antioxidantes (Rivero *et al.*, 2011).

En el mundo existen diferentes variedades de orégano que han sido explotadas comercialmente. La producción global del orégano es estimada en alrededor de 15000 toneladas, siendo Turquía el principal productor seguido de México. Las especies de mayor importancia económica son: *Origanum vulgare* L. spp. *Viride* (Boiss) Hayak (orégano griego), *Origanum onites* L. (orégano turco), *Thymus capitatus* (L) Hoffmanns y Link, *Coridothymus capitatus* (L) (orégano español perteneciente a la familia Lamiaceae) y *Lippia graveolens* H:B:K (orégano mexicano, de la familia Verbenaceae) (Oliveira *et al.*, 2007; citado por García *et al.*, 2012).

Esta planta cuenta con numerables beneficios para la salud, tanto para la prevención como para el tratamiento de enfermedades crónico degenerativas. No obstante, la mayoría de la investigación se ha centrado en identificar las propiedades de su aceite esencial, descartando la presencia de los compuestos fenólicos, los cuales también poseen importantes beneficios para la salud. Se ha demostrado que el orégano, tomillo y canela tienen propiedades antioxidantes, relacionadas con los compuestos fenólicos, carvacrol y el timol que pueden ser utilizados bajo ciertas condiciones como fungicidas y bactericidas. (Aballa y Rosen, 2001).

Paster *et al.*, 1990, 1995 (citados por García *et al.*, 2006) reportaron el efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) sobre el desarrollo de *A. flavus*, *A. ochraceus* K, Wilh y *A. niger* Tiegh *in vitro*, encontrando que a 2000 ppm este aceite controla el crecimiento micelial de los hongos en estudio y tiene actividad fungicida. Los mismos autores demostraron que el aceite esencial de orégano controló *in vivo* eficientemente el desarrollo de hongos endógenos en trigo (*Triticum* sp). En condiciones *in vitro* el aceite esencial de orégano (*Lippia origanoides*) presenta un efecto fungicida sobre el fitopatógeno *Phytohthora infestans* de la papa, la concentración del aceite que permitió una inhibición del crecimiento del patógeno de 50 % fue de 20.53 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por lo cual, el autor afirma que este aceite esencial podría ser incorporado dentro de un programa de manejo integral de la enfermedad del tizón tardío de la papa (Arango *et al.*, 2015).

En cuanto al maguey morado (*Tradescantia spathacea* Swartz), Domínguez (2004) menciona que esta planta es conocida como “maguey morado o barquilla”, de la familia Commelinaceae, la cual es muy utilizada en la medicina tradicional en México como antiinflamatorio y en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. La acción bactericida de los extractos de esta especie fue comprobada utilizando los microorganismos *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexner*. Esta es una planta endémica del sureste mexicano empleada para prevenir o tratar problemas de tipo infeccioso, cáncer, gangrena, várices, lavar heridas, tos, etc (Morton, 1968). González *et al.*, (2003); citado por Reyes *et al.*, (2009) atribuyeron al maguey propiedades antioxidantes, antígenotóxicas y antimutagénicas; los mismos autores encontraron que el maguey morado contiene carotenos, polifenoles de tipo flavonoide y compuestos cumarínicos.

Por otro lado, el jengibre (*Zingiber officinale* R.) es una planta nativa de Asia, cultivada en numerosas partes del mundo, incluyendo el oeste de la India, Jamaica y África. El jengibre es una planta herbácea cuyo rizoma es perenne, nudoso, con una corteza de color ceniciento y rugosidades transversas, de sabor picante e intensamente aromático. Posee ciertas características y principios activos que la hacen adecuada para el uso tradicional de trastornos como la falta de apetito, o el dolor de articulaciones, debido a sus propiedades antirreumáticas. Por sus propiedades expectorantes y antitusivas que posee es muy utilizado para tratar resfriados o gripe, además de aliviar la acumulación de secreciones en los pulmones y también, para tratar casos en que se presenta mucha tos, así como también favorecer la disminución de colesterol en la sangre (Alonso *et al.*, 2012).

El aceite esencial y la oleorresina obtenidas del jengibre son de gran interés para el sector alimenticio y medicinal, debido a diferentes partes asociadas a su consumo tales como capacidad antioxidante (Stoilova *et al.*, 2007 y Taghizadeh *et al.*, 2007; citados por Reyes *et al.*, 2011); antiespasmódico y antidiarreico (World Health

Organization, 1999; citado por Reyes *et al.*, 2011). Adicionalmente, el aceite esencial de jengibre se compone de sustancias como monoterpenos y sesquiterpenos, responsables de las correspondientes características sensoriales (Gong *et al.*, 2004). El aceite esencial de jengibre es obtenido tradicionalmente por destilación con arrastre de vapor o extracción (Vázquez *et al.*, 2001). Además esta planta ha mostrado efectos sobre la inhibición de diversos tipos de bacteria y hongos que causan enfermedades en animales y en plantas de cultivo, tanto a nivel de campo como en la poscosecha (Nguefack, 2004; Barrera y Bautista, 2008; Ramírez, 2008b).

Existen diversas investigaciones que demuestran el potencial de los extractos de plantas en el manejo de problemas fitosanitarios ocasionados por hongos, tal es el caso de López *et al.*, (2009) quienes evaluaron el efecto antifúngico *in vitro* de extractos de *Thymus vulgaris* y *Heliotropium indicum* sobre *Phytophthora palmivora*, para lo cual evaluaron cuatro formas de obtención de extractos (hidrolato, presurizado, fermentación aeróbica y anaeróbica); los autores mencionan que de un total de ocho extractos evaluados a concentraciones del 50 %, cuatro inhibieron el crecimiento del patógeno, cuatro presentaron efecto antiesporulante. La CMI con efectos antifúngicos de extractos de *Heliotropium indicum* en hidrolato fue de 40 % y para el fermentado anaeróbico 10 %. Por otro lado, el *Thymus vulgaris* en hidrolato fue del 30 % y en fermentado aeróbico fue del 50 %. Por lo cual, concluyeron que los extractos de *Thymus vulgaris* y *Heliotropium indicum* poseen metabolitos capaces de inhibir el crecimiento y producción de zoosporas *in vitro* de *Phytophthora palmivora*.

Bolívar *et al.*, (2009) evaluaron el efecto de la aplicación de los extractos etanólicos de hojas de *Azadirachta indica* (nim), *Phyllanthus niruri* (flor escondida), *Calotropis procera* (algodón de seda), *Lippia iriganoides* (orégano silvestre), *Gliricidia sepium* (matarratón) y *Heliotropium indicum* (rabo de alacrán) en el control de la antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de mango (*Mangifera indica*) y observaron que el extracto etanólico de orégano silvestre y rabo de alacrán ocasionaron la mayor inhibición del crecimiento micelial del hongo, el orégano y mata ratón fueron los mejores tratamientos de poscosecha ya que indujeron el 37 y 33 % menos de la enfermedad en los frutos de mango. El extracto más significativo fue el orégano, el cual en dosis bajas podría ser utilizado para prevenir la enfermedad; sin embargo, el matarratón, rabo de alacrán, algodón de seda, flor escondida y nim fueron también efectivos en la reducción de la enfermedad y los autores recomiendan evaluarlos en dosis más altas.

Lozada *et al.* (2012) demuestran el efecto *in vitro* de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *M. roreri* agente causante de la moniliasis del cacao y observaron que en concentraciones de 800 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ todos los aceites esenciales inhibieron completamente la germinación y el crecimiento micelial del hongo. A una dosis menor (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), los aceites de *L. origanoides* inhibieron

hasta en 100% el crecimiento micelial y en 96% la germinación de esporas.

Ramírez *et al.*, (2011a) investigaron el efecto *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* sobre *M. roreri*, los autores encontraron que las tres plantas muestran metabolitos con efectos de inhibición sobre el crecimiento y producción de conidias del hongo causante de la moniliasis del cacao, siendo el hidrolato por destilación la forma más eficiente. Los hidrolatos de orégano y maguey morado al 50 % y el jengibre al 30 % inhibieron completamente el patógeno.

Ramírez (2013) estudiaron extractos obtenidos de *Pimenta dioica* L, *Zingiber officinale* Roscoe, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Moniliophthora roreri*. El trabajo lo realizaron en tres fases: la primera en laboratorio, la segunda en una plantación monoclonal y la tercera mediante cromatografía de gases. Los autores reportaron que todas las plantas poseen metabolitos con capacidad de inhibir en mayor o menor grado el desarrollo del patógeno. Los hidrolatos de canela, clavo y pimienta en medio líquido inhibieron la multiplicación y germinación de las conidias. En condiciones de campo, en frutos inoculados como en la plantación comercial con incidencia natural del 69,6 % de *M. roreri*, los hidrolatos de clavo y canela al 20 % mostraron la mayor efectividad, permitiendo obtener el 98% de frutos sanos y un incremento en la producción entre un 800 y un 1000 %, con respecto al testigo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Agrotecnologías de la Agencia Universitaria para el Desarrollo (AUDES) Cacao-Chocolate de la UNACH, ubicado en Ciudad Universitaria, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, en donde se realizaron pruebas de efectividad de los extractos, así como también se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.2 Materiales

3.2.1 Material biológico

En el Cuadro 1 se aprecia el material vegetal utilizado para llevar a cabo la presente investigación.

Cuadro 1. Material vegetal evaluado.

Nombre científico	Nombre común	Parte utilizada
<i>Origanum vulgare</i> L	orégano	hojas y tallo
<i>Tradescantia spathacea</i> Swartz	maguey morado	hojas
<i>Zingiber Officinale</i> Roscoe	jengibre	rizoma

3.2.2 Material de laboratorio

En cuanto a los equipos de laboratorio utilizados para desarrollar la investigación constan: cámara de flujo laminar, destilador, autoclave, microscopio, incubadora, agitador magnético, licuadora, balanza; así también se utilizó materiales como cajas Petri, varilla, matraz Erlenmeyer, vaso de precipitación, pipetas, probetas, gotero, contador, cámara de Neubauer, agujas, piceta, pinzas, sacabocados, medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y extracto de cacao, agar, jugo V8[®], agua destilada, alcohol, hipoclorito de sodio, tween, bolsas de tela, algodón, envases (opaco, transparente, ámbar).

3.3 Métodos

La presente investigación se llevó a cabo en condiciones *in vitro* en tres fases, en la primera fase se determinó la relación soluto-solvente en el proceso de extracción mediante destilación de orégano, maguey morado y jengibre sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *Moniliophthora roreri*, en la segunda fase se definió las mejores mezclas de los destilados de las tres plantas evaluadas y, en la tercera fase se estableció las condiciones más adecuadas de almacenaje como son:

tipo de recipiente (opaco, ámbar y transparente) y condiciones de almacenaje (temperatura de refrigeración a 4 °C y temperatura ambiente) para conservar la efectividad del fungicida formulado. En la Figura 4 se detalla el diseño de la investigación.

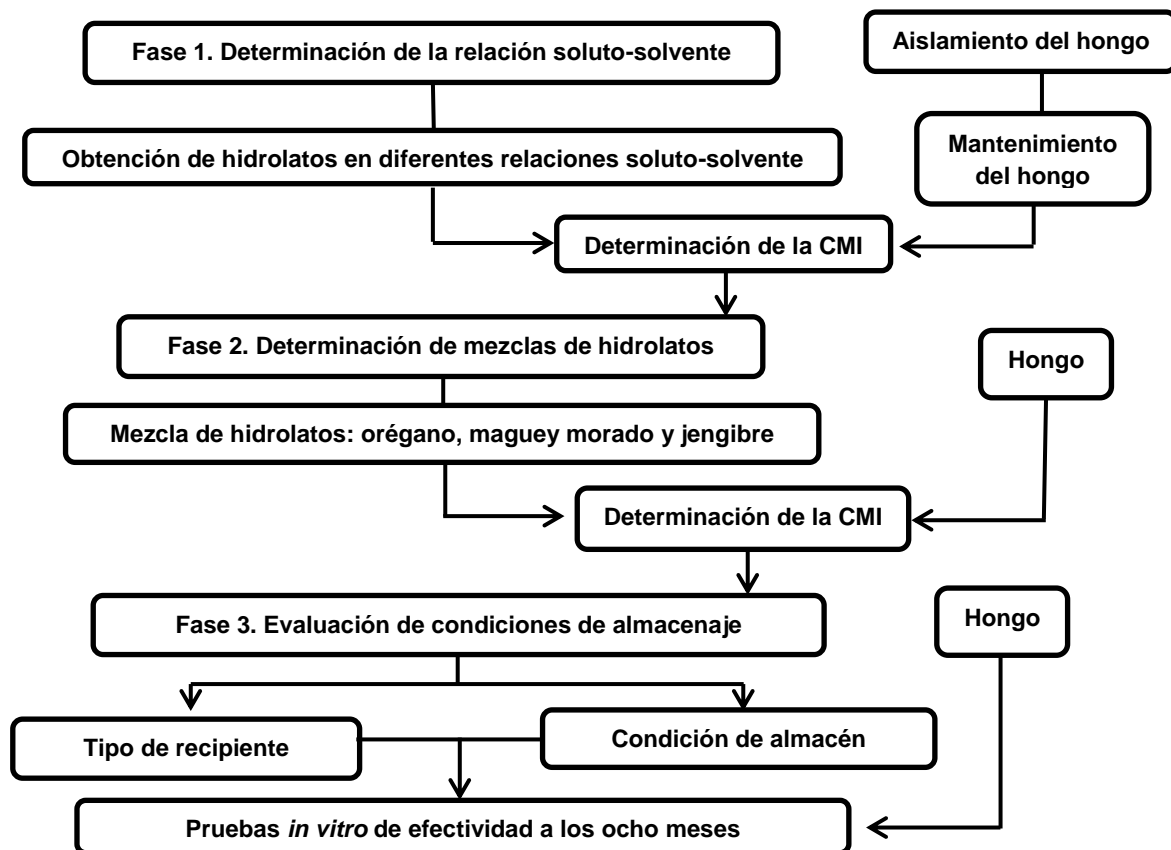


Figura 4. Diseño de la investigación.

3.3.1 Fase 1. Determinación de la relación óptima de soluto y solvente

3.3.1.1 Multiplicación del hongo *Moniliophthora roreri*

Previo al montaje del ensayo, se aisló el hongo *Moniliophthora roreri* a partir de frutos enfermos en estado de mancha colectados en plantaciones del municipio de Tecpatán, Chiapas, los cuales fueron trasladados al laboratorio para ser lavados y desinfectados. Posteriormente se dejó esporular con el fin de coleccionar sus conidias y multiplicar el patógeno mediante repiques o pases en medios de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), extracto de cacao y jugo V8[®]. Se incubó a una temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 12 días (Figura 5).



Figura 5. Aislamiento del patógeno a) frutos en estado de mancha; b) multiplicación

3.3.1.2 Obtención de hidrolatos

Los hidrolatos se realizaron a partir de las siguientes plantas: orégano (*Origanum vulgare* L.), maguey morado (*Tradescantia spathacea* Swartz) y jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). De cada planta se obtuvo hidrolatos tanto con planta fresca (300 g L^{-1} y 600 g L^{-1}) como con material secado al sol (45 g L^{-1} y 90 g L^{-1}) cada uno obtenido con dos relaciones agua-alcohol (10:1 y 10:0) (Figura 6). Para lo cual se acondicionó el material vegetal, lavándolo, picándolo y pesando la cantidad necesaria. El material vegetal se colocó en bolsas de tela para posteriormente ser introducido en la marmita del destilador junto con la mezcla de solvente correspondiente a las diferentes relaciones (10:1 y 10:0), luego se sella herméticamente para hacer el proceso de extracción continuo mediante la aplicación de calor y presión constante, el vapor fue conducido a un condensador y mediante enfriamiento con agua se obtuvo el hidrolato, el mismo que se almacenó para su uso posterior.

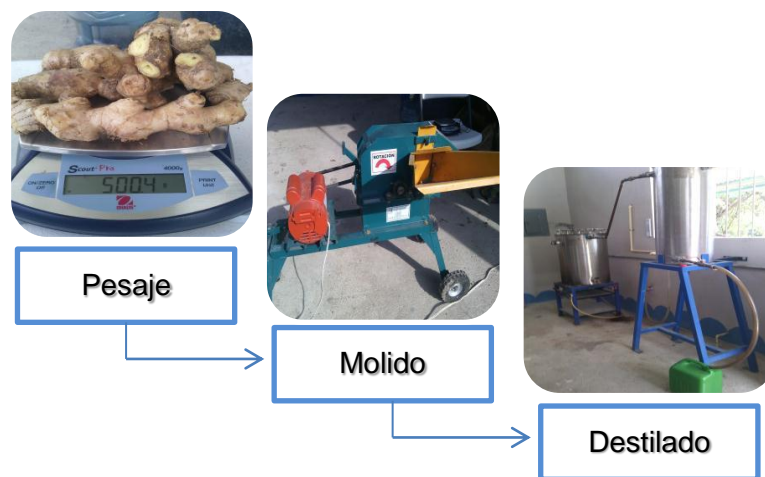


Figura 6. Procedimiento general para la elaboración de hidrolatos.

3.3.1.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para los hidrolatos obtenidos

Para montar en ensayo exploratorio, se utilizó el medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) preparado en la cantidad necesaria. Luego se vació el medio en las cajas Petri de plástico estériles con una mezcla de PDA y extracto obtenido con agua en concentraciones de 50, 40, 30, 20 y 10 % y de cada una de estas concentraciones se tuvieron cuatro repeticiones. Posteriormente cuando las cajas Petri se enfriaron se procedió a sembrar *M. roseri*, mediante el uso de un sacabocados. Estos procedimientos se realizaron en una cámara de flujo laminar y en condiciones de completa asepsia. Las cajas se mantuvieron en incubación a una temperatura de 23 ± 2 °C. Además se contó con dos testigos: uno absoluto, en el cual el hongo fue cultivado en PDA sin ningún control y uno químico (polisulfuro de calcio). Para un total de 122 tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos de orégano, maguey morado y jengibre.

Tratamiento	Peso g L ⁻¹	Estado de la planta	Relación agua-alcohol
01, M1, J1	300	Fresco	10:1
02, M2, J2	600	Fresco	10:1
03, M3, J3	300	Fresco	10:0
04, M4, J4	600	Fresco	10:0
05, M5, J5	45	Seco	10:1
06, M6, J6	90	Seco	10:1
07, M7, J7	45	Seco	10:0
08, M8, J8	90	Seco	10:0

Variables cuantificadas:

Las variables que se estudiaron fueron: crecimiento del micelio, para lo cual se midió a cada una de las placas el crecimiento micelial (Figura 7). También se cuantificó el número de conidias totales y germinadas, esto realizando un raspado superficial del micelio y se efectuaron las diluciones necesarias hasta que las conidias se pudieron contar utilizando la cámara de Neubauer. Es de mencionar que las conidias germinadas (figura 8) son aquellas que dan inicio al tubo germinativo y son las responsables de causar la infección.



Figura 7. Crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri*.



Figura 8. Conidia de *Moniliophthora roreri* desarrollando el tubo germinativo.

Diseño experimental y análisis estadístico

En el trabajo se empleó diseño completamente al azar con 122 tratamientos incluidos dos testigos (absoluto y químico) y cuatro repeticiones por tratamiento, se realizó análisis de varianza a cada una de las variables cuantificadas y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey al 5%, usando el software SPSS[®] versión 17.

3.3.2 Fase 2. Determinación de mezclas de hidrolatos

Con base a los resultados obtenidos en la fase 1, se llevó a cabo el ensayo exploratorio *in vitro* de la fase 2. Es decir; los extractos que presentaron inhibición total del crecimiento del micelio y formación de conidias se utilizaron en esta fase, para lo cual se evaluó la mezcla de las mejores relaciones de soluto-solvente y se probaron las mezclas de material vegetal de orégano, maguey morado y jengibre (Cuadro 3).

Cuadro 3. Proporciones de volumen para la elaboración de las mezclas.

Orégano	Maguey	Jengibre	Clave
1	1	0	T1
1	0	1	T2
0	1	1	T3
2	1	0	T4
2	0	1	T5
1	2	0	T6
1	0	2	T7
0	1	2	T8
0	2	1	T9
1	1	1	T10
2	1	1	T11
1	2	1	T12
1	1	2	T13
2	2	1	T14
2	1	2	T15
1	2	2	T16

Se realizó el medio de cultivo con la técnica de medio envenenado descrito en la Fase 1 y se evaluó a concentración de 30% v/v.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó diseño completamente al azar con 17 tratamientos incluido el testigo absoluto (PDA) y cada tratamiento contó con tres repeticiones, se practicó análisis de varianza a cada una de las variables evaluadas y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey al 5%, usando el software SPSS® versión 17.

3.3.3 Fase 3. Evaluación de condiciones de almacenaje

Con base a los resultados obtenidos en la fase anterior, se evaluó el comportamiento de las dos mejores mezclas de destilados de orégano, maguey morado y jengibre. Los tratamientos que se evaluaron fueron: tipo de recipiente a utilizar (opaco, ámbar o transparente), condiciones de almacenaje (temperatura de refrigeración a 4°C, temperatura ambiente), para lo cual, a los ocho meses se realizó medios de cultivo a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) resultante de la fase 2 y se evaluó el crecimiento y formación de conidias de *M. royeri*. Se montó un ensayo utilizando un total de 24 tratamientos y tres repeticiones (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos evaluados con base a los resultados obtenidos en la fase 2 (a los ocho meses de su obtención).

Maguey-jengibre (1:1)			
Concentración	Temperatura de almacenaje	Tipo de recipiente	Clave
40%	Ambiental	Opaco	T1
40%	Ambiental	Ámbar	T2
40%	Ambiental	Transparente	T3
30%	Ambiental	Opaco	T4
30%	Ambiental	Ámbar	T5
30%	Ambiental	Transparente	T6
40%	4°C	Opaco	T7
40%	4°C	Ámbar	T8
40%	4°C	Transparente	T9
30%	4°C	Opaco	T10
30%	4°C	Ámbar	T11
30%	4°C	Transparente	T12
Maguey-jengibre (1:2)			
40%	Ambiental	Opaco	T13
40%	Ambiental	Ámbar	T14
40%	Ambiental	Transparente	T15
30%	Ambiental	Opaco	T16
30%	Ambiental	Ámbar	T17
30%	Ambiental	Transparente	T18
40%	4°C	Opaco	T19
40%	4°C	Ámbar	T20
40%	4°C	Transparente	T21
30%	4°C	Opaco	T22
30%	4°C	Ámbar	T23
30%	4°C	Transparente	T24

De la misma manera, se utilizaron los resultados obtenidos en la fase 1 (O1, M1 y J1 con una CMI de 40%) y, se realizó un ensayo con 18 tratamientos y tres repeticiones (Cuadro 5) y se determinó la efectividad del fungicida formulado por un periodo de ocho meses. Además se realizó observaciones a los productos con respecto a su olor, color y sedimentación.

Cuadro 5. Tratamientos evaluados con base a los resultados de la fase uno (ocho meses).

Tratamiento	Temperatura de almacenaje	Tipo de recipiente	Clave
O1	Ambiental	Opaco	T1
	Ambiental	Ámbar	T2
	Ambiental	Transparente	T3
	4 °C	Opaco	T4
	4 °C	Ámbar	T5
	4 °C	Transparente	T6
M1	Ambiental	Opaco	T7
	Ambiental	Ámbar	T8
	Ambiental	Transparente	T9
	4 °C	Opaco	T10
	4 °C	Ámbar	T11
	4 °C	Transparente	T12
J1	Ambiental	Opaco	T13
	Ambiental	Ámbar	T14
	Ambiental	Transparente	T15
	4 °C	Opaco	T16
	4 °C	Ámbar	T17
	4 °C	Transparente	T18

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fase 1. Determinación de la relación óptima de soluto y solvente

En el Cuadro 6 se detalla el tiempo utilizado para obtener los hidrolatos de orégano, maguey morado y jengibre tanto en planta fresca como seca al sol, se aprecia que los destilados elaborados a partir del *Origanum vulgare* L. se elaboraron en tiempos que varían de 1 h 42 min a 2 h 55 min, esto probablemente depende de la cantidad de material vegetal y de la relación agua-alcohol utilizada en cada tratamiento. Los tratamientos elaborados con *Tradescantia spathacea* utilizan de 1 h 55 min a 3 h 28 min para obtener cada destilado y el tiempo de destilación utilizado para los tratamientos de *Zingiber officinale*, van de 2 h 12 min a 4 h 55 min respectivamente.

Cuadro 6. Tiempo utilizado para la destilación de orégano, maguey morado y jengibre.

Tratamiento	Tiempo de destilación
O1	2 h 06 min
O2	2 h 55 min
O3	2 h 11 min
O4	2 h 13 min
O5	2 h 22 min
O6	2 h 30 min
O7	2 h 00 min
O8	1 h 42 min
M1	2 h 46 min
M2	2 h 39 min
M3	3 h 05 min
M4	3 h 28 min
M5	3 h 12 min
M6	2 h 14 min
M7	2 h 06 min
M8	1 h 55 min
J1	2 h 36 min
J2	2 h 54 min
J3	2 h 12 min
J4	2 h 42 min
J5	3 h 47 min
J6	4 h 55 min
J7	3 h 07 min
J8	3 h 08 min

4.1.1 Evaluación del extracto de orégano sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de *Moniliophthora roreri*

El crecimiento micelial del hongo causante de la infección, se puede observar en la figura 9, donde cada hidrolato de orégano obtenido tanto con material vegetal fresco como seco provoca efectos diferentes al crecimiento del micelio, en este caso se evaluaron cinco concentraciones (50, 40, 30, 20 y 10 %).

Los resultados obtenidos para el extracto de orégano mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *M. roreri*, según el análisis de varianza realizado (Cuadro 1A), el cual indicó que existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos estudiados; Tukey ($P \leq 0.05$) y en la formación de conidias: totales y germinadas (Cuadro 7) a concentraciones de 50 y 40 % V/V. Es decir, los tratamientos O1, O2, O3, O5 y O6 presentaron un porcentaje de inhibición del 100 %, tanto para crecimiento micelial como para formación de conidias; en este caso la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 40 %. Estos datos mejoran los resultados obtenidos por Ramírez *et al.*, (2011a) quienes mencionan que el hidrolato de orégano al 50 % inhibe completamente el patógeno.

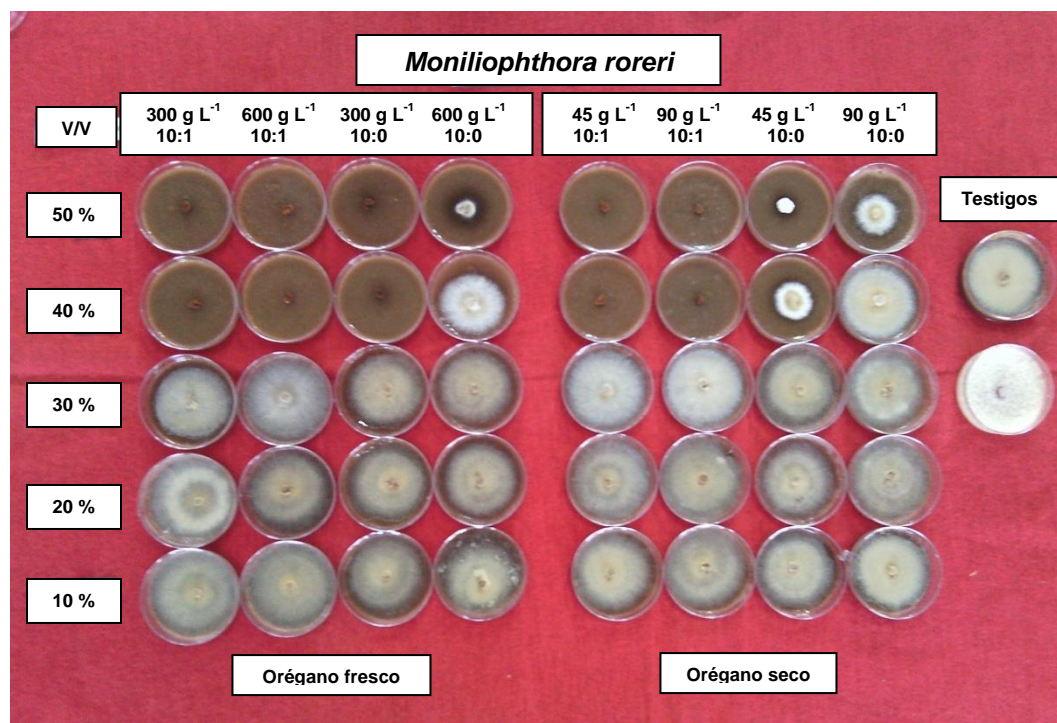


Figura 9. Aspecto del crecimiento micelial de *M. roreri* por efecto del extracto de orégano.

Es muy importante señalar que para extraer la mayor cantidad de metabolitos presentes en la planta fue necesario utilizar 300 g L⁻¹ (planta fresca) y la relación

agua-alcohol como solvente (10:1), ya que al utilizar material seco los metabolitos presentes en la planta al parecer se degradaron. Los resultados concuerdan con Álvarez *et al.* (2008) quienes evaluaron la influencia del método de secado de las hojas del género *Erythroxylum confusum*, sobre la composición fitoquímica y variación de los metabolitos, recomendando utilizar el secado a la sombra del material vegetal como vía para ahorrar recursos y eliminar posible descomposición de los metabolitos.

Los tratamientos O4, O7 y O8 permitieron el crecimiento del micelio y formación de conidias en todas las concentraciones; sin embargo, el orégano tuvo un efecto inhibitorio sobre la germinación de las mismas a concentraciones de 50 y 40 %; resultados que concuerdan con lo reportado por Ramírez *et al.*, (2011a) quienes mencionan que todos los extractos obtenidos de orégano inhibieron la formación de conidias entre el 100 y 71 % a pesar de que, como se vio anteriormente, se presentó formación de micelio, por lo tanto estos extractos muestran actividad antiesporulante.

Según los datos obtenidos en esta investigación, el extracto de orégano tiene efecto regulador del hongo *M. royeri* causante de la enfermedad, sumándose a los resultados reportados por Montes *et al.*, (2000), quienes evaluaron las propiedades antifúngicas de 206 plantas superiores entre ellas el *Origanum vulgare* contra 26 especies de hongos fitopatógenos tales como: roya del café *Uromyces appendiculatus*, cenicilla *Erysiphe cichoracearum*, mildiú de calabacita *Pseudoperonospora cubensis* y tizón del crisantemo *Dydimella chrisanthemi*. Cáceres *et al.* (2013) determinaron el efecto inhibitorio del clavo *Eugenia caryophyllata*, canela *Cinnamomum zeylanicum* y orégano de la variedad *Lippia berlandieri* obtenidos mediante la técnica de Hidrodestilación sobre seis de los principales patógenos que atacan a los alimentos (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp, *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*), los autores mencionan que el extracto acuoso de orégano presentó mayor actividad biológica frente a los hongos en estudio, demostrando así tener mayor inhibición de los patógenos.

La comparación de medias (Cuadro 2A) mostró diferencias significativas Tukey ($P \leq 0.05$) entre los hidrolatos de orégano obtenidos al compararlos con el testigo químico (Polisulfuro de calcio) y absoluto (PDA), el cual registró el mayor valor de esporulación con 951.94×10^5 conidias totales $m L^{-1}$ y, en cuanto a las conidias germinadas registró 6.66×10^5 conidias germinadas $m L^{-1}$, mientras que el tratamiento O1 mostró los mejores resultados ya que no presentó formación de conidias; además de que el hidrolato obtenido en este tratamiento comparado con los demás tratamientos que presentaron inhibición del micelio y formación de conidias de *M. royeri*, utilizó menos tiempo de destilación (2 h 06 min), eficientando con ello el tiempo y el consumo de energía requerida para su extracción.

Cuadro 7. Efecto del extracto de orégano sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roseri*.

Tratamiento		Crecimiento (mm)	Conidias Totales (m L ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias Germinadas (m L ⁻¹ x10 ⁵)
O1	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	47.50 de	72.63 abc	0.00 a
	20	48.00 de	132.01 bcde	0.08 a
	10	48.75 de	147.16 bcdef	0.13 a
O2	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	50.00 e	71.66 abc	0.00 a
	20	50.00 e	85.00 abcd	0.00 a
	10	50.00 e	204.79 efgh	1.87 a
O3	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	48.50 de	167.38 cdef	0.00 a
	20	48.50 de	190.86 defgh	0.08 a
	10	49.00 de	206.61 efgh	0.08 a
O4	50	12.50 b	102.08 abcde	0.00 a
	40	43.50 d	107.15 abcde	0.00 a
	30	48.00 de	117.63 bcde	0.00 a
	20	48.00 de	136.66 bcdef	0.00 a
	10	47.75 de	187.81 defg	0.69 a
O5	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	48.00 de	39.51 ab	0.00 a
	20	48.75 de	123.26 bcde	0.00 a
	10	49.00 de	291.59 gh	0.69 a
O6	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	46.75 e	0.41 a	0.00 a
	20	47.00 de	130.55 bcde	0.00 a
	10	48.50 de	243.63 fgh	0.19 a
O7	50	12.50 b	59.63 abc	0.00 a
	40	23.00 c	60.12 abc	0.00 a
	30	47.25 de	65.83 abc	0.00 a
	20	47.25 de	168.95 cdef	0.20 a
	10	48.25 de	205.50 efgh	0.34 a
O8	50	18.50 b	112.50 bcde	0.00 a
	40	49.00 de	122.91 bcde	0.00 a
	30	47.50 de	143.61 bcdef	0.00 a
	20	47.75 de	283.29 gh	0.08 a
	10	49.25 e	301.15 h	0.09 a
T. Absoluto		50.00 a	591.94 i	6.66 b
T. Químico		0.00 a	0.00 a	0.00 a
CV		0.66	1.00	5.21

Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la Prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$)

Estos datos coinciden con los valores reportados por Ramírez *et al.*, (2011a) quienes mencionan que *O. vulgare* inhibe completamente el desarrollo del hongo. Según Carrillo *et al.*, (2010 reportado por Kordal *et al.*, 2008) mencionan que el carvacrol y el timol son compuestos de unidades terpénicas presentes en los aceites esenciales de algunas especies de la familia Lamiaceae como *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Mentha piperita*, de los cuales se han encontrado que actúan causando alteraciones en la morfología y agregados hifales, lo que hace que se reduzca el crecimiento y se produzca lisis en la pared y la membrana celular del agente patógeno. Por otro lado, García (2012) señala que el orégano tiene propiedades nutraceuticas, entre las que destacan las propiedades antioxidantes, hipoglucémicas, hipotensivas y anticancerígenas.

4.1.2 Evaluación del extracto de maguey morado sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de *Moniliophthora roreri*

El efecto del extracto del maguey morado frente el crecimiento micelial del hongo se aprecia en la Figura 10, el mismo que fue evaluado a diferentes concentraciones (50, 40, 30, 20 y 10 %) Se puede observar que los tratamientos M1, M2, M5, M6 y M7 inhiben el crecimiento micelial del patógeno en un 100% a concentraciones de 50 y 40 %; por lo que su CMI fue del 40 %.

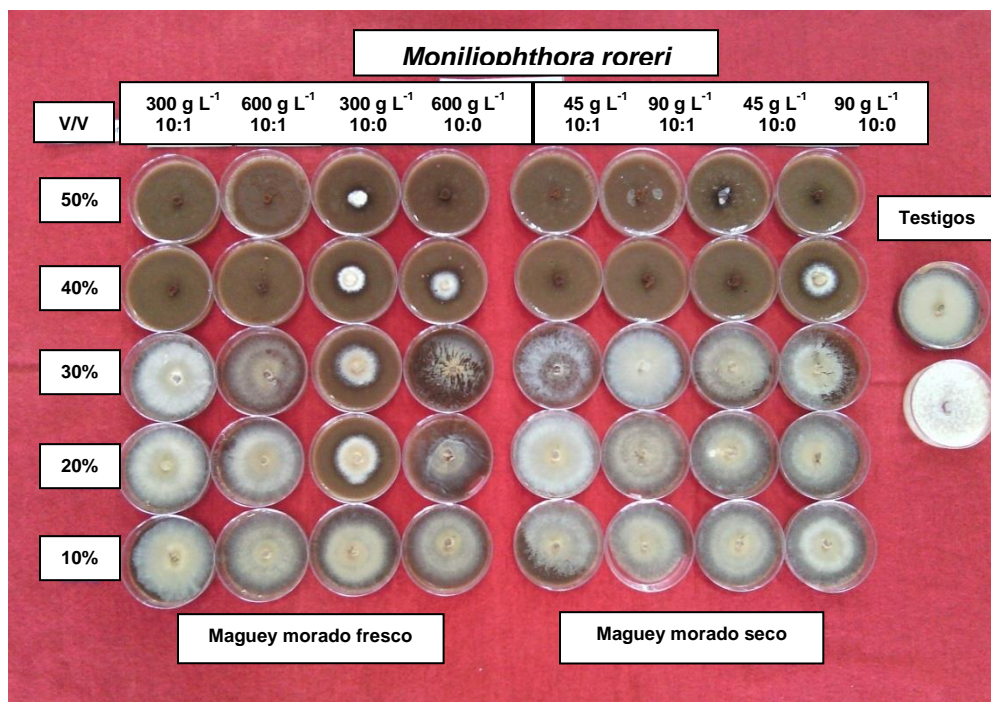


Figura 10. Aspecto del crecimiento micelial de *M. roreri* por efecto del extracto de maguey morado.

Cuadro 8. Efecto del extracto de maguey morado sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. royeri*.

Tratamiento		Crecimiento (mm)	Conidias totales (m L ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias germinadas (m L ⁻¹ x10 ⁵)
M1	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	47.50 f	80.58 abcdefg	0.00 a
	20	48.00 ef	101.75 defghi	0.20 a
	10	48.25 ef	156.94 ghi	0.50 a
M2	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	45.75 ef	12.77 abcd	0.00 a
	20	46.5 ef	69.84 abcdef	0.00 a
	10	49.00 ef	82.34 abcdefg	0.37 a
M3	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	15.00 b	2.69 a	0.00 a
	30	22.25 c	5.41 ab	0.00 a
	20	22.25 c	11.08 abcd	0.00 a
	10	38.75 d	43.97 abcde	0.00 a
M4	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	24.00 c	0.00 a	0.00 a
	30	45.00 e	0.00 a	0.00 a
	20	47.00 ef	41.87 abcd	0.00 a
	10	49.00 f	185.66 i	0.00 a
M5	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	50.00 f	7.77 abc	0.00 a
	20	50.00 f	107.47 efghi	0.00 a
	10	50.00 f	120.97 efghi	0.13 a
M6	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	48.25 ef	117.81 efghi	0.00 a
	20	50.00 f	131.04 efghi	0.00 a
	10	50.00 f	144 fghi	0.00 a
M7	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	48.50 ef	88.12 abcdefgh	0.00 a
	20	49.00 ef	96.94 bcdefghi	0.00 a
	10	49.25 ef	128.54 efghi	0.00 a
M8	50	26.00 c	52.36 abcdef	0.00 a
	40	50.00 f	99.79 cdefghi	0.00 a
	30	48.00 ef	110.09 efghi	0.00 a
	20	50.00 f	122.31 efghi	0.00 a
	10	50.00 f	180.62 hi	1.66 a
T. Absoluto		50.00 a	591.94 j	6.66 b
T. Químico		0.00 a	0.00a	0.00 a
CV		0.73	1.51	5.52

Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Los tratamientos M3 y M4 a concentración de 50 % presentan inhibición total del hongo; pero a concentraciones de 40 %, presentaron porcentajes de inhibición del 52 al 70 %. Con respecto al tratamiento M8, éste inhibió 48 % el crecimiento micelial del hongo a 50 % de concentración (Cuadro 8). El M1 fue el tratamiento que permitió mayor extracción de metabolitos, los cuales inhibieron el crecimiento micelial, así como también fue el que presentó el menor tiempo utilizado para obtener el extracto (2 h 46 min), comparado con los extractos elaborados con material seco. El Análisis de varianza practicado reporta que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 1A). En la prueba de comparación de Tukey ($P \leq 0.05$) las medias de todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el testigo. Los resultados obtenidos en cuanto al crecimiento micelial son corroborados por Ramírez *et al.* (2011a) quienes reportan que el *Tradescantia spathacea* mediante el proceso de extracción por destilación, logró inhibir completamente el crecimiento del patógeno.

La información generada en esta investigación demuestra que el maguey morado posee metabolitos capaces de inhibir el crecimiento del hongo causante de la enfermedad ya que su CMI fue del 40 %; mejorando con ello los reportado por Ramírez *et al.* (2011a) quienes mencionan que el hidrolato de maguey morado al 50 % inhibe completamente el patógeno. Pupo *et al.*, (2010) Afirman que el maguey morado tiene potencial antifúngico frente al agente causal del tizón temprano del tomate (*Solanum lycopersicum*), ya que los autores evaluaron extractos vegetales de once plantas, entre las cuales los extractos de *Cleome gynandra*, *Tradescantia pallida* (Rose) y *Tradescantia spathacea*; sin embargo, no alcanzaron el 10 % de inhibición con ninguna de las dosis utilizadas en el estudio. Por lo cual los datos de estos autores difieren con los resultados obtenidos en la presente investigación.

Investigaciones demuestran que el *T. spathacea* posee compuestos con estructura tipo flavónico, cuyas propiedades tiene efecto de inhibición en la formación de tumores, así como también los extractos polares del grupo de las cumarinas tiene efectos bactericida sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri* según Ramírez *et al.*, (2011a; reportado por González *et al.*, 2003).

Los resultados con respecto a la formación de conidias totales y germinadas (Cuadro 8) muestran que hay diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos (Cuadro 2A); es decir, los tratamientos M1, M2, M4, M5, M6 Y M7 presentan inhibición en la formación de conidias totales y germinadas a concentraciones de 50 y 40 %, siendo el valor más bajo su CMI (40 %). El tratamiento M3 a concentración del 50 % inhibió la formación de conidias, pero a concentración del 40 % presentó 2.69×10^5 conidias totales $m L^{-1}$; aunque en este caso las conidias no lograron formar el tubo germinativo.

El efecto del maguey morado en el tratamiento M8 muestra que a pesar que se presentó formación de conidias en un rango de 52.69×10^5 a 180.62×10^5 conidias totales $m L^{-1}$ en las cinco concentraciones evaluadas, no logran germinar, por lo tanto no permitiría que se produjera la infección del patógeno en el fruto y así mismo se reduce la producción de conidias al compararse con el testigo absoluto el cual registró un valor de 591.94×10^5 conidias $m L^{-1}$, y 6.66×10^5 conidias germinadas. Estos resultados se suman a reportes de diferentes autores, como: Domínguez (2004) quien reporta que el maguey morado tiene efectos para el tratamiento gastrointestinal, problemas inflamatorios, así como acción bactericida de esta especie frente a *Escherichia coli*, *salmonella enteriditis* y *Shigella tlexnery*; las hojas de maguey morado utilizadas para la elaboración de los extractos tuvieron una humedad de 91%, estos datos concuerdan con lo reportado por Reyes *et al.*, (2009) quienes expresaron que la humedad de las hojas frescas del maguey morado es de 91.5 %.

4.1.3 Evaluación del extracto de jengibre sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de *Moniliophthora roreri*

En la Figura 11 se aprecia el crecimiento micelial del patógeno por efecto del hidrolato de jengibre obtenido con material fresco y seco en dos relaciones. En el Cuadro 9 se detalla el efecto del extracto frente al hongo causante de la moniliasis del cacao a cinco concentraciones (50, 40, 30, 20 y 10 %). Como se observa, los tratamientos J1, J2, J5 y J6 inhiben el crecimiento micelial del patógeno al utilizar la relación 10:1, esto a concentraciones de 50 y 40 %, con un porcentaje de inhibición del 100 % siendo su CMI del 40 %. Estos datos difieren con los resultados reportados por Ramírez *et al.*, (2011a) quienes afirman que el hidrolato de jengibre fue el que registró la mayor efectividad ya que su CMI es la más baja 30 % (V/V) mientras que el testigo absoluto (PDA) presentó un crecimiento micelial de 50 mm. Estos resultados son corroborados por el Análisis de Varianza (Cuadro 1A y 2A), ya que indica que existen diferencias entre los tratamientos estudiados. En la prueba de comparación de Tukey ($P \leq 0.05$) las medias de todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el testigo. Como se observa que los tratamientos J3, J4, J7 y J8 presentan inhibición del crecimiento micelial en porcentajes que van del 0 al 58 % a las cinco concentraciones evaluadas; por lo que los metabolitos presentes en el jengibre fueron extraídos en menor cantidad ya que se utilizó agua como solvente, sumado a que el material vegetal fue secado al sol.

Al parecer el tratamiento J1 que para su obtención se utilizó material vegetal fresco y agua-alcohol como solvente fue el más eficiente en el proceso de extracción, requiriéndose un tiempo en el proceso de destilación de 2 h 36 min. Los resultados obtenidos en la presente investigación coinciden con los reportados por Nguetack *et*

al. (2004), quienes evaluaron el efecto inhibitorio de extractos de *Cymbopogon citratus*, *Monodora myristica*, *Ocinum gratissimum*, *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* frente a tres hongos de los alimentos *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, encontrando que los hidrolatos de las cinco plantas presentan metabolitos que inhiben el crecimiento y formación de conidias de los tres hongos estudiados.

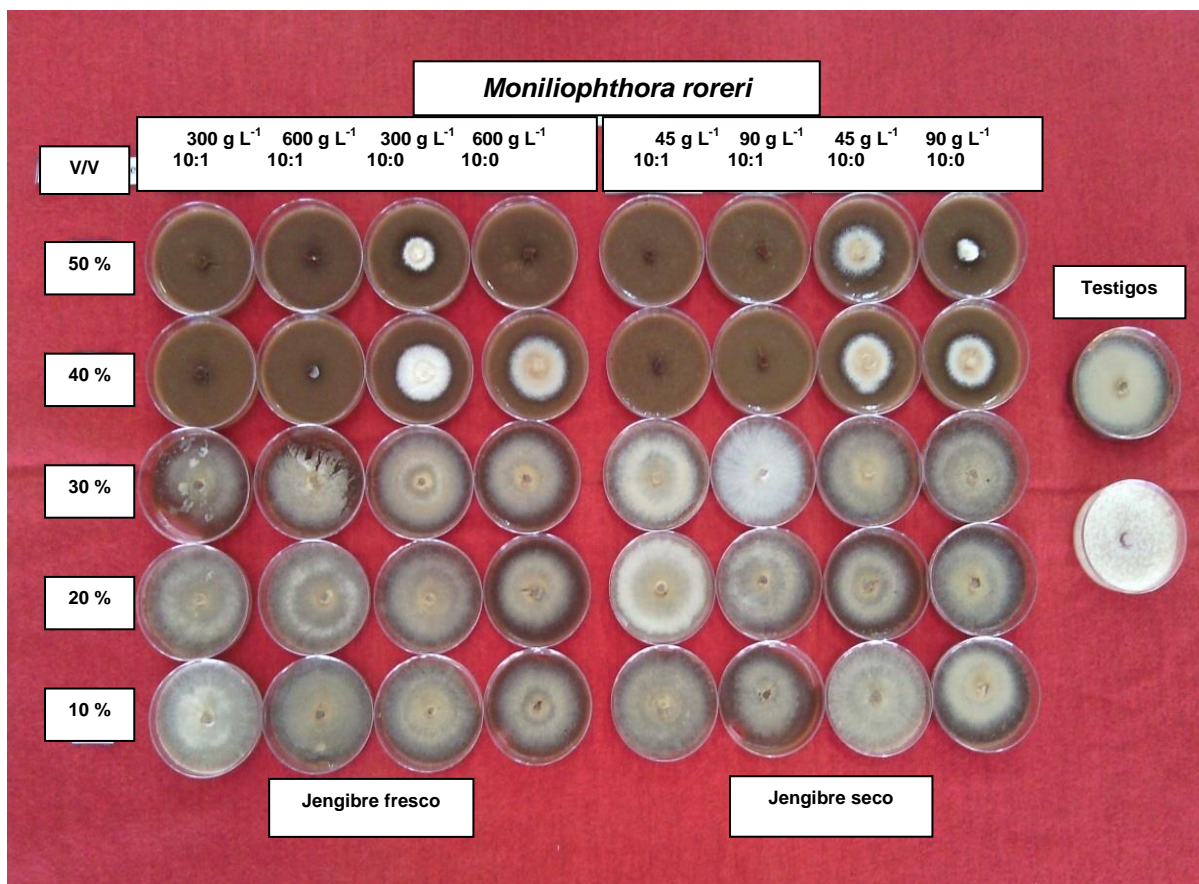


Figura 11. Aspecto del crecimiento micelial de *M. roreri* por efecto del extracto de jengibre.

García *et al.* (2013) evaluaron el aceite esencial del jengibre frente a *Fusarium verticillioides* y la producción de fumonisina, reportando que los aceites esenciales del jengibre tienen efectos inhibitorios contra el hongo estudiado, ya que las estructuras de las microconidias del hongos presentan cambios en cuanto a su morfología, además de la inhibición de la producción de fumonisina. Por otro lado, se observa que los tratamientos J1, J2 (fresco), J5 y J6 (seco) obtenidos en relación 10:1 inhibieron la formación y germinación de conidias a 50 y 40 % y, los tratamientos J3, J4 (fresco) y J7, J8 (seco) en relación 10:0 registraron 100 % de inhibición en conidias germinadas, a pesar de que permitieron la formación de conidias, sin embargo están por debajo del total de conidias del testigo absoluto (PDA) cuyo valor fue de 591.94×10^5 conidias totales m L⁻¹.

Cuadro 9. Efecto del extracto de jengibre sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. royeri*.

Tratamiento		Crecimiento (mm)	Conidias totales (m L ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias germinadas (m L ⁻¹ x10 ⁵)
J1	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	43.25 h	50.83 ab	0.00 a
	20	45.50 h	107.5 bcde	0.00 a
	10	45.75 h	99.25 bcde	0.00 a
J2	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	47.25 h	156.7 cdef3	0.00 a
	20	49.00 h	162.91 def	0.06 a
	10	49.75 h	170.34 ef	0.20 a
J3	50	22.00 c	75.90 abcd	0.00 a
	40	32.00 de	83.40 abcde	0.00 a
	30	44.00 h	101.52 bcde	0.00 a
	20	47.00 h	217.08 fg	0.00 a
	10	47.25 h	277.37 g	0.06 a
J4	50	31.00 de	41.75 b	0.00 a
	40	33.00 defg	51.87 ab	0.00 a
	30	41.75 fh	71.25 abcd	0.00 a
	20	42.00 gh	82.08 abcde	0.04 a
	10	42.00 gh	164.02 def	0.13 a
J5	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	48.75 h	63.88 abc	0.00 a
	20	49.00 h	74.65 abcd	0.00 a
	10	49.25 h	83.61 abcde	0.00 a
J6	50	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	40	0.00 a	0.00 a	0.00 a
	30	48.50 h	24.44 ab	0.00 a
	20	48.50 h	42.09 ab	0.00 a
	10	49.00 h	80.00 abcde	0.00 a
J7	50	31.00 cde	24.16 ab	0.00 a
	40	33.00 defg	67.36 abc	0.00 a
	30	31.75 efgh	96.83 bcde	0.00 a
	20	40.75 h	298.12 g	0.00 a
	10	43.00 h	305.83 g	0.00 a
J8	50	21.00 b	77.22 abcd	0.00 a
	40	29.00 bcd	88.47 abcde	0.00 a
	30	47.00 h	115.62 bcde	0.00 a
	20	47.00 h	170.41 ef	0.00 a
	10	48.00 h	229.79 fg	0.00 a
T. Absoluto		50.00 h	591.94 h	6.66 b
T. Químico		0.00 a	0.00 a	0.00 a
CV		0.58	1.13	7.19

Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Peña *et al.* (2004) muestran el efecto de diferentes extractos vegetales (ajo, jengibre, nim, zábila, entre otros) contra *Thielaviopsis paradoxa* de piña, causante de la pudrición negra de la planta. Por su parte, Ramírez (2013) menciona que el hidrolato de seis plantas evaluadas (orégano, maguey, jengibre, canela, pimienta y clavo de olor) tiene efecto regulador sobre *M. roreri* del cacao. Sivasothy *et al.*, (2011) evaluaron los aceites esenciales de jengibre obtenidos por Hidrodestilación de las hojas y rizomas de la planta, encontrando que los aceites obtenidos tanto de la hoja como del rizoma del *Zingiber officinale* var. *Rubrum* Theilade, poseen actividades antibacterianas contra bacterias Gram positivas *Bacillus cheniformis* *Bacillus spizizenii* y *Staphylococcus aureus*, además efecto contra las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas stutzeri*.

4.2 Fase 2. Determinación de mezclas de hidrolatos

A partir de los resultados obtenidos en la Fase 1, se evaluó la mezcla de las mejores relaciones soluto-solvente. En esta fase se probaron los tres mejores tratamientos evaluados en la fase anterior; es decir, los tratamientos O1, M1 y J1 obtenidos a partir de material vegetal fresco utilizando 300 g L⁻¹ y la relación agua-alcohol (10:1); ya que según los datos obtenidos, estos extractos fueron los que inhibieron en su totalidad el crecimiento y formación de conidias de *M. roreri* de cacao en condiciones de laboratorio.

4.2.1 Efecto de mezclas de dos extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roreri*

En la figura 12, se aprecia el efecto de las mezclas de hidrolatos utilizando únicamente dos de las tres plantas evaluadas sobre la inhibición del crecimiento micelial del hongo a 30 % de concentración V/V.

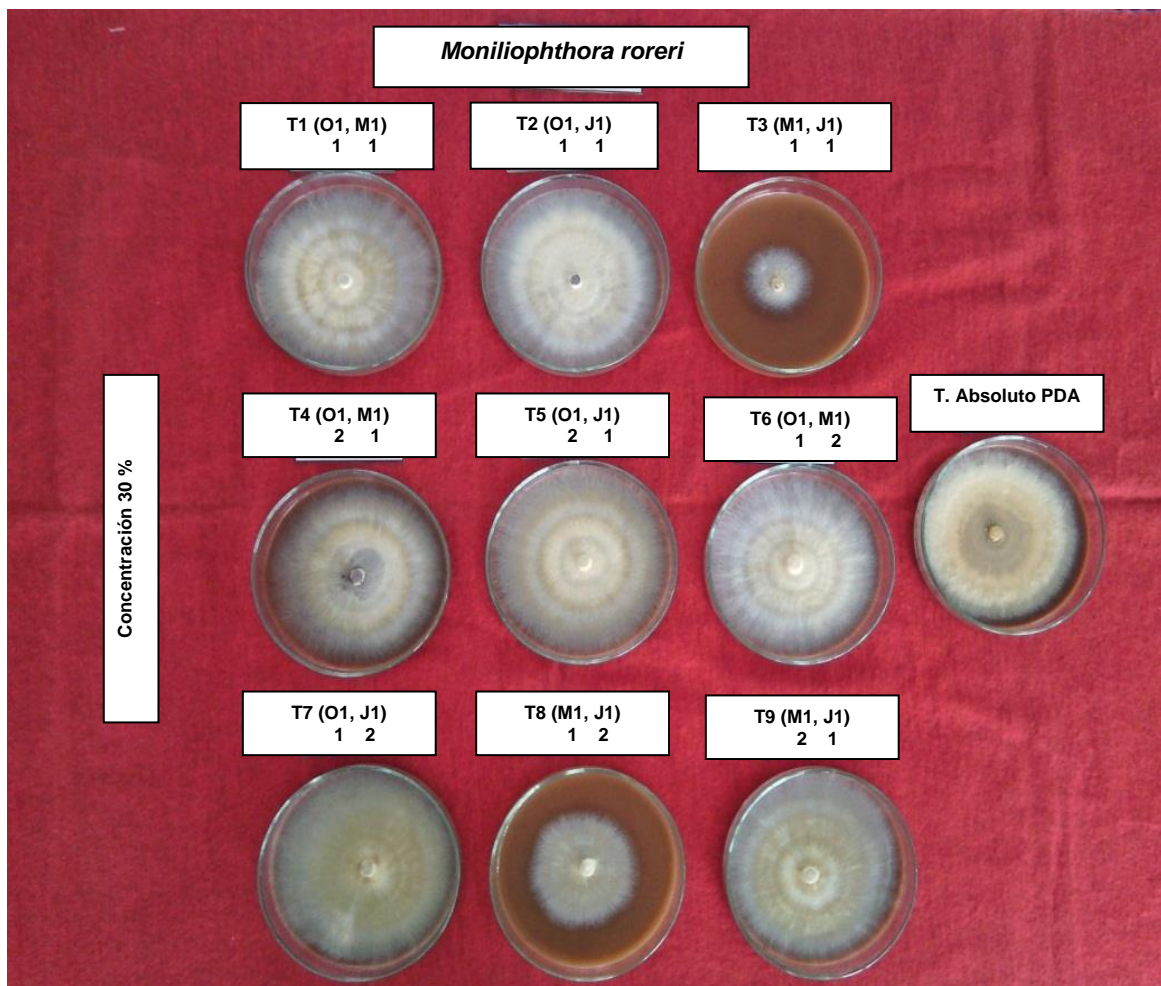


Figura 12. Aspecto del crecimiento micelial de *M. roreri* por efecto de dos extractos vegetales.

Según los resultados obtenidos en esta fase (Cuadro 10) se observa que el tratamiento T3, que fue el que utilizó una parte de maguey y una parte de jengibre mostró los mejores resultados, debido a que inhibió en un 63 % el crecimiento micelial del patógeno; seguido del tratamiento T8 elaborado con una parte de maguey y dos partes de jengibre; en este caso el porcentaje de inhibición del micelio fue del 61 %. Por otro lado, los tratamientos T7, T9, T2 y T1 presentaron inhibición del crecimiento micelial del hongo en 8.9 %, 5.6 %, 3,4 % y 2.2 % respectivamente. Los tratamientos que permitieron el crecimiento micelial del hongo en un 100 % fueron T4, T5 y T6 presentando el mismo comportamiento que el testigo absoluto.

Cuadro 10. Efecto de dos extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. royeri*.

Tratamiento		Crecimiento (mm)	Conidias totales (m L ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias germinadas (m L ⁻¹ x10 ⁵)
T1	30 %	88.00 d	295.44 ab	0.33 a
T2	30 %	87.00 d	478.19 ab	0.00 a
T3	30 %	33.00 a	31.50 a	0.00 a
T4	30 %	90.00 d	507.08 ab	0.50 a
T5	30 %	90.00 d	498.88 ab	0.55 a
T6	30 %	90.00 d	57.50 a	0.33 a
T7	30 %	82.00 d	625.91 ab	0.55 a
T8	30 %	35.00 a	108.75 a	0.16 a
T9	30 %	85.00 d	525.76 ab	0.55 a
T17. T. Abs.		90.00 d	1013.88 b	3.88 b
CV		0.25	0.73	2.21

Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Estos resultados son corroborados con el Análisis estadístico practicado, ya que según este existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 3A). La Prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) separa los tratamientos que tuvieron un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo de los demás tratamientos. En este caso los tratamientos T3 y T8 tuvieron el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial del patógeno con respecto al testigo absoluto.

Con relación al número de conidias totales y germinadas, se observa que el tratamiento T3 y T2 inhibieron en un 100 % la germinación de conidas de *M. royeri* seguido del tratamiento T8 que registró 95.87 % de inhibición respecto al testigo absoluto (Tratamiento 17), el cual presentó el mayor valor (3.88×10^5 conidias germinadas m L⁻¹).

Por su parte, el tratamiento T6 (una parte de orégano y dos partes de maguey) a pesar de que permitió el crecimiento micelial en un 100%, presentó inhibición en la formación y germinación de conidias, registrando valores de 57.50×10^5 conidias totales m L⁻¹ y 0.33×10^5 conidias germinadas m L⁻¹, resultados que están por debajo de los registrados por el testigo. Como se aprecia, todos los tratamientos evaluados permitieron la formación de conidias en un rango del 31.50 a 625.91×10^5 conidias totales m L⁻¹, valores inferiores a los registrados por el testigo absoluto (1013.88×10^5 conidias totales m L⁻¹).

4.2.2 Efecto de mezclas de tres extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roseri*

En la Figura 13, se observa el efecto de las mezclas de hidrolatos utilizando las tres plantas evaluadas (orégano, maguey morado y jengibre) sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roseri* en condiciones de laboratorio.

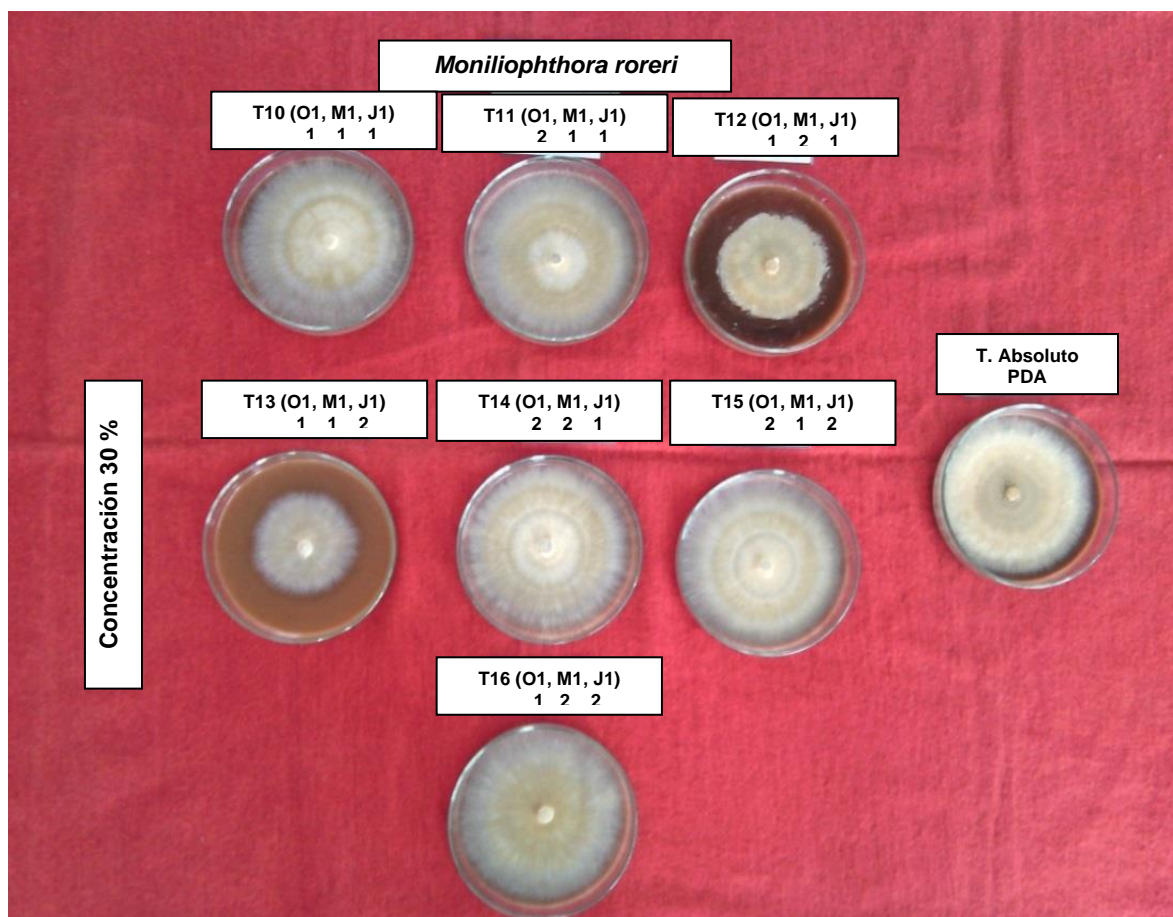


Figura 13. Aspecto del crecimiento micelial de *M. roseri* por efecto de tres extractos vegetales.

En el cuadro 11 se detalla que el tratamiento que presentó mayor inhibición (44 %) del crecimiento micelial del patógeno fue el T13 (una parte de orégano, una de maguey morado y dos de jengibre), seguido del tratamiento T12 (una parte de orégano, dos de maguey y una parte de jengibre) que registró un porcentaje de inhibición micelial del 33 % y, el tratamiento T14 inhibió en un 8.9 % en crecimiento micelial del hongo, es de mencionar que todos los tratamientos fueron comparados con el testigo absoluto (PDA), el cual mostró crecimiento total del micelio.

Por su parte, en la variable de formación de conidias todos los tratamientos evaluados permitieron la formación de las mismas en rango del 240.91 al 689.76

$\times 10^5$ conidias totales $m L^{-1}$, los cuales son inferiores los registrados por el testigo absoluto (1013.88×10^5 conidias totales $m L^{-1}$)

En la variable de conidias germinadas, el análisis de varianza registró diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Cuadro 3A). La prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) mostró como las mezclas de hidrolatos presentaron diferencias con el testigo absoluto, el cual mostró el mayor valor con 3.88×10^5 conidias germinadas $m L^{-1}$. Es decir, los tratamientos T12, T13, T14 y T16 inhibieron en un 100 % la germinación de las mismas a 30 % de concentración. Mientras que los demás tratamientos presentaron porcentajes de inhibición que van entre 87.11 al 94.32.

Cuadro 11. Efecto de tres extractos vegetales sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri*.

Tratamiento		Crecimiento (mm)	Conidias totales ($m L^{-1} \times 10^5$)	Conidias germinadas ($m L^{-1} \times 10^5$)
T10	30 %	90.00 d	621.69 ab	0.50 a
T11	30 %	90.00 d	512.83 ab	0.22 a
T12	30 %	60.00 c	270.00 ab	0.00 a
T13	30 %	50.00 b	240.91 a	0.00 a
T14	30 %	82.00 d	457.55 ab	0.00 a
T15	30 %	90.00 d	689.76 ab	0.27 a
T16	30 %	90.00 d	518.19 ab	0.00 a
T17 (absoluto)		90.00 d	1013.88 b	3.88 b
CV (%)		0.25	0.73	2.21

Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

De acuerdo con la información generada en esta fase, Los tratamientos T3 y T8 inhibieron en mayor grado el crecimiento y formación de conidias de *M. roreri*. Sin embargo, en el tratamiento T3 en el cual se utilizó una parte de extracto maguey morado y una parte de extracto de jengibre a 30 % V/V, su efecto resultó con menor actividad sobre *M. roreri* que el que registraron los extractos por separado (fase 1) sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roreri*. El tratamiento T8 (una parte de extracto de maguey morado y dos partes de extracto de jengibre) que en esta fase presentó buenos resultados (inhibición del micelio del patógeno en 61 %), no mostró buen efecto al ser comparado con los obtenidos en la fase anterior.

Los resultados anteriores indican que al realizar las mezclas de hidrolatos, se obtienen mayores inhibiciones de *M. roreri* cuando se realiza mezclas de los extractos vegetales que de tres. Los resultados obtenidos en esta fase se pueden deber a la sinergia o no de los compuestos activos de cada planta utilizada en esta investigación.

Estos datos son corroborados por autores como Orbe *et al.* (2013) quienes evaluaron la actividad alelopática de los extractos etanólico y metanólico de las hojas de cinco especies vegetales amazónicas: *Miconia cazaletti*, *Iryanthera paraensis*, *Chrysochlamys membranacea*, *Vitex triflora* y, *Theobroma obovatum*, a través de la medida del efecto de estimulación o inhibición sobre el crecimiento de los hipocótilos y radículas de semillas de *Lactuca sativa*. Los autores encontraron que en casi todas las plantas estudiadas se detectaron efectos inhibitorios y superiores al 50% en las radículas. *Chrysochlamys membranacea* presentó la mejor actividad cuando se emplearon extractos metanólicos y etanólicos. Además, mencionan que los resultados de actividad obtenidos en las fracciones de *Chrysochlamys membranacea* se pueden deber a muchos factores como: sinergia de los compuestos activos, la actividad de compuestos volátiles (aceite esencial) que se perdieron durante el fraccionamiento, la inestabilidad de compuestos activos sobre la sílica empleada, la presencia de compuestos termosensibles, etc.

Sin embargo, los datos obtenidos difieren con los resultados reportados por Espinosa *et al.* (2012), quienes evaluaron el efecto sinérgico de taninos y flavonoides presentes en las hojas de almendro de la india (*Terminalia catappa* L) sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. Los experimentos biológicos arrojaron la existencia de un efecto sinérgico evidenciando en el extracto inicial donde el nivel de inhibición en el crecimiento micelial fue mayor que el de los metabolitos por separados. La dilución del 25 % no produjo efecto inhibitorio en ninguno de los dos hongos evaluados. *R. solani*.

Akila *et al.* (2011; reportado por Villa *et al.*, 2014) evaluaron en banana la eficacia de una formulación comercial a base de trompeta del diablo (*Datura metel*), que contenía también agentes emulsificantes, estabilizadores y solventes, así como los extractos metanólicos de hoja de esta misma planta, y algunos microorganismos de control biológico que controlaron sinérgicamente a *F.oxysporum* f. sp. *cubense*. El extracto metanólico redujo el crecimiento micelial en un 90 %, mientras que en condiciones de campo, la mezcla del fungicida botánico comercial, con microorganismos de control biológico y los extractos vegetales, mostraron una reducción hasta del 65 % de la marchitez de banana (*Musa sapientum*), resultados que superan la efectividad de cada uno por separado.

Villa *et al.* (2014) mencionan que las mezclas de compuestos con propiedad antifúngica encontrados en las plantas pueden afectar a patógenos diferencialmente, ya sea de manera individual o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones. Jasso *et al.*, (2006) estudiaron las propiedades fungicidas de extractos etanólicos de tres especies de la llamada maravilla de campo (*Flourensia* spp.), contra *F. oxysporum*, donde el desarrollo micelial fue inhibido más del 90 % con el uso de los tres extractos.

4.3 Fase 3. Evaluación de condiciones de almacenaje

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en la fase 1 y 2, se evaluó el comportamiento de las dos mejores mezclas de destilados de maguey morado y jengibre (1:1 y 1:2) a 40 y 30 % de concentración (fase 2); así como también, se determinó el efecto de los hidrolatos de orégano, maguey morado y jengibre a 40 % de concentración (Fase 1) sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri*. Ambos ensayos se realizaron a los 8 meses de almacenaje de los hidrolatos, los cuales se mantuvieron 4 °C y a temperatura ambiente; además, se utilizó tres envases diferentes (opaco, ámbar y transparente).

4.3.1. Efecto de la mezcla de los destilados de maguey morado y jengibre a los ocho meses de su obtención sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roreri*

En la figura 14 se observa el efecto de las mezclas de los destilados de maguey morado y jengibre en proporciones de volumen (1:1 y 1:2) a 30 y 40 % v/v a los ocho meses de su obtención a dos temperaturas (temperatura ambiente y temperatura de refrigeración 4 °C) y utilizando tres envases (opaco, ámbar y transparente) sobre la inhibición del crecimiento del micelio del hongo *M. roreri*.

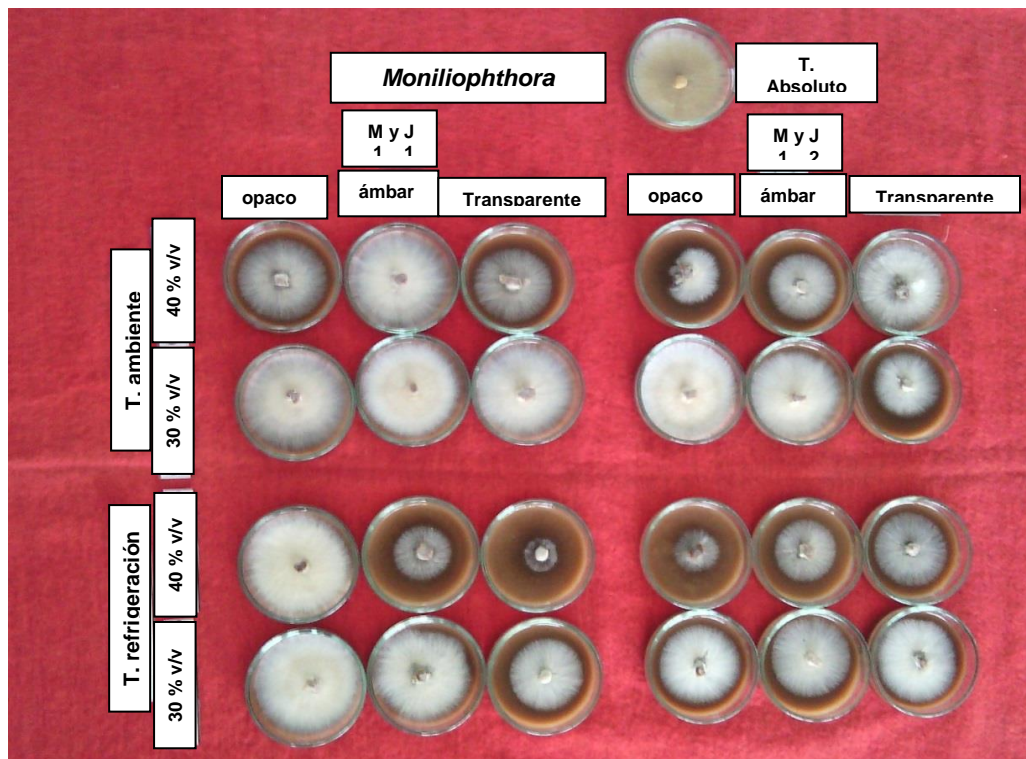


Figura 14. Aspecto del crecimiento micelial de *M. roreri* por efecto de los destilados de maguey morado y jengibre en proporciones (1:1 y 1:2) a los ocho meses de su obtención.

En el Cuadro 12 se observa que al utilizar los destilados de maguey morado y jengibre en relación 1:1 a 40 % de concentración, el tratamiento T9 (40 % v/v, temperatura de refrigeración, relación 1:1 y envase transparente) presentó el más alto porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo reportando 47.0 %; seguido de los tratamientos T3 (40 % v/v, temperatura ambiente, relación 1:1 y envase transparente) y T8 (40 % v/v, temperatura de refrigeración, relación 1:1 y envase ámbar); los cuales registraron 27.52 % de inhibición para el tratamiento T8 y para el tratamiento T3 un 29.53 % de inhibición.

Además se aprecia que al utilizar los destilados de maguey morado y jengibre pero a relación 1:2; los tratamientos T19 (40 % v/v, temperatura de refrigeración, relación 1:2 y envase opaco) y T13 (40 % v/v, temperatura ambiente, relación 1:2 y envase opaco) presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del patógeno del 53.69 % para el T19 y del 35.57 % para el tratamiento T13.

El análisis estadístico (Cuadro 4A), registra que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados, en la prueba de comparación de Tukey ($P \leq 0.05$) las medias de todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con el testigo absoluto. Referente al conteo de conidias totales y germinadas, se observa que el tratamiento T19 inhibió totalmente la formación de conidias totales del hongo *M. roreri*, coincidiendo con los resultados reportados en el cuadro 12 que muestra que este tratamiento obtuvo el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo. Por otro lado, los tratamientos T1, T12, T14, T15, T19, T20, T21, T22 y T24 a pesar de haber presentado porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del patógeno en rangos que van del 17.45 % al 53.69 %, registraron inhibición total de formación de conidias respecto al testigo absoluto.

Los tratamientos evaluados con relación 1:1 presentaron valores que van del (0 al 13.50×10^5 conidias totales $m L^{-1}$); y por consiguiente, los tratamientos evaluados con relación 1:2 registraron valores que van del (0 al 8.72×10^5 conidias totales $m L^{-1}$), cuyos valores se encuentran por debajo de los registrados por el testigo absoluto, que presentó (887.36×10^5 conidias totales $m L^{-1}$) y (5.00×10^5 conidias germinadas $m L^{-1}$). Es de recalcar que todos los tratamientos evaluados en esta fase, inhibieron en su totalidad las conidias germinadas causantes de la infección.

Con lo anterior, se resume que el tratamiento T19 (40 % v/v, temperatura de refrigeración, relación 1:2 y envase opaco) es el que presentó buenos resultados en esta fase, sobre la inhibición del crecimiento micelial, formación y germinación de conidias. Sin embargo, al almacenar los destilados de maguey morado y jengibre por un lapso de 8 meses, la efectividad de los extractos tiende a disminuir ya sea por efecto del color del envase utilizado y las condiciones de temperatura usadas para su almacén. Los hidrolatos que mantuvieron su efectividad en mayor porcentaje fueron

aquellos que se almacenaron en temperatura de refrigeración (4 °C) y en envases no transparentes (opaco y ámbar); además, se utilizó envases de plástico debido a que este tipo de material evita que haya desprendimiento de toxinas, es cómodo, versátil y económico.

Cuadro 12. Efecto de los extractos de maguey morado y jengibre en proporciones (1:1 y 1:2) a los ocho meses de su obtención sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri*.

Codificación	Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales (m L ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias germinadas (m L ⁻¹ x10 ⁵)
T1	40 % M,J (1:1) T.A ¹ , opaco	36.67 b,c,d,e,f,g	0.00 a	0.00 a
T2	40 % M,J (1:1) T.A ¹ , ámbar	44.67 d,e,f,g,h	2.50 a	0.00 a
T3	40 % M,J (1:1) T.A ¹ , transp	35.00 b,c,d,e,f	4.00 a	0.00 a
T4	30 % M,J (1:1) T.A ¹ , opaco	46.67 g,h	2.66 a	0.00 a
T5	30 % M,J (1:1) T.A ¹ , ámbar	46.67 g,h	13.50 a	0.00 a
T6	30 % M,J (1:1) T.A ¹ , transp	46.33 f,g,h	3.16 a	0.00 a
T7	40 % M,J (1:1) T.R ² , opaco	44.33 d,e,f,g,h	4.50 a	0.00 a
T8	40 % M,J (1:1) T.R ² , ámbar	36.00 b,c,d,e,f,g	0.50 a	0.00 a
T9	40 % M,J (1:1) T.R ² , transp	26.33 a,b	3.11 a	0.00 a
T10	30 % M,J (1:1) T.R ² , opaco	44.00 d,e,f,g,h	5.16 a	0.00 a
T11	30 % M,J (1:1) T.R ² , ámbar	46.00 e,f,g,h	12.75 a	0.00 a
T12	30 % M,J (1:1) T.R ² , transp	39.67 c,d,e,f,g,h	0.00 a	0.00 a
T13	40 % M,J (1:2) T.A ¹ , opaco	32.00 a,b,c	1.50 a	0.00 a
T14	40 % M,J (1:2) T.A ¹ , ámbar	36.00 b,c,d,e,f,g	0.00 a	0.00 a
T15	40 % M,J (1:2) T.A ¹ , transp	38.00 c,d,e,f,g	0.00 a	0.00 a
T16	30 % M,J (1:2) T.A ¹ , opaco	47.00 g,h	8.72 a	0.00 a
T17	30 % M,J (1:2) T.A ¹ , ámbar	44.67 d,e,f,g,h	0.50 a	0.00 a
T18	30 % M,J (1:2) T.A ¹ , transp	37.33 b,c,d,e,f,g	1.00 a	0.00 a
T19	40 % M,J (1:2) T.R ² , opaco	23.00 a	0.00 a	0.00 a
T20	40 % M,J (1:2) T.R ² , ámbar	34.33 a,b,c,d	0.00 a	0.00 a
T21	40 % M,J (1:2) T.R ² , transp	34.67 b,c,d,e	0.00 a	0.00 a
T22	30 % M,J (1:2) T.R ² , opaco	38.67 c,d,e,f,g,h	0.00 a	0.00 a
T23	30 % M,J (1:2) T.R ² , ámbar	36.00 b,c,d,e,f,g	0.50 a	0.00 a
T24	30 % M,J (1:2) T.R ² , transp	41.00 c,d,e,f,g,h	0.00 a	0.00 a
T25. T. Abs.		49.67 h	887.36 b	5.00 b
CV		0.006	0.46	4.93

¹ Temperatura ambiente ² Temperatura refrigeración

Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

De acuerdo con Alarcón (2008), los extractos de plantas deben ser almacenados en lugares donde no exista alteración de temperatura y de ser posible envasar en recipientes de plástico para evitar futuras oxidaciones; protegiendo así al producto de

la luz y la humedad, evitando que se produzcan reacciones físicas o químicas que puedan alterar la calidad del mismo Angulo *et al* (2012). Por otro lado, autores como Cruz y Sánchez (2004) afirman que para conservar la efectividad, los extractos deben guardarse en un frasco oscuro, cerrado, etiquetado y de ser posible en un lugar fresco o bajo refrigeración.

Tomando en cuenta el tiempo de almacenamiento de los hidrolatos (ocho meses), los resultados obtenidos en esta fase de investigación registran baja efectividad sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roreri* comparados con los datos obtenidos en la fase 1 y 2. Es decir, con el tiempo la efectividad de cada extracto disminuye y las propiedades óptimas del producto no se mantienen. Por lo cual, los extractos almacenados a temperatura ambiente perdieron en mayor porcentaje su efectividad en el control de *M. roreri* de cacao durante el tiempo establecido que los almacenarlos en refrigeración (4 °C).

La información generada en este estudio se corrobora con lo reportado por Infante *et al* (2015), quienes evaluaron el efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la actividad de extractos etanólicos de *Lantana camara* L y *Heliotropium indicum* L sobre antracnosis. Los autores mencionan que la temperatura y el tiempo de almacenamiento son determinantes para la efectividad de los extractos etanólicos, debido a que en su investigación reportan que los extractos etanólicos de *Lantana camara* L y *Heliotropium indicum* a 8 °C no perdieron su efectividad en el control de antracnosis a los 12 meses de almacenamiento; y a los 26°C disminuyeron su efecto sobre la inhibición micelial, esporulación y formación de conidias del hongo a los seis y ocho meses de ser preparados.

Estrada *et al* (2005) evaluaron *in vitro* el efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* contra *Salmonella* sp y *Escherichia coli* a diferente tiempo y temperatura de almacenamiento, encontrando resultados muy variables a los 0°, 4° y 25 °C a un tiempo de 30 días; es decir, *Lactobacillus plantarum* fue estable en el tiempo de estudio a las diferentes temperaturas, a 4°C la actividad bactericida disminuyó desde el día 10 hasta el día 30; en cambio, a 25 °C la actividad permaneció constante hasta el día 20 y disminuyó drásticamente en el día 30. El extracto de *Lactobacillus brevis* se comportó de manera diferente, a 0 °C la actividad fue estable durante todo el tiempo de estudio, a 4 °C disminuyó en el día 20 y permaneció estable hasta el día 30; sin embargo, a 25 °C se registró una inestabilidad caracterizada por un aumento hacia el día 20 y una disminución en el día 30. Los autores concluyen que 0 y 4 °C son temperaturas buenas de almacenamiento, no solo para la estabilidad del extracto, sino también para la actividad frente a estos microorganismos.

4.3.2. Efecto de los hidrolatos de orégano, maguey morado y jengibre a los ocho meses de su obtención sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roreri*

En la figura 15 se observa el efecto de los destilados de orégano, maguey morado y jengibre (O1, M1 y J1) a 40 % de concentración sobre la inhibición del crecimiento micelial del hongo *M. roreri*. Los destilados se mantuvieron por ocho meses de almacenaje a dos temperaturas (temperatura ambiente y temperatura de refrigeración) y, utilizando tres tipos de envase (opaco, ámbar y transparente).

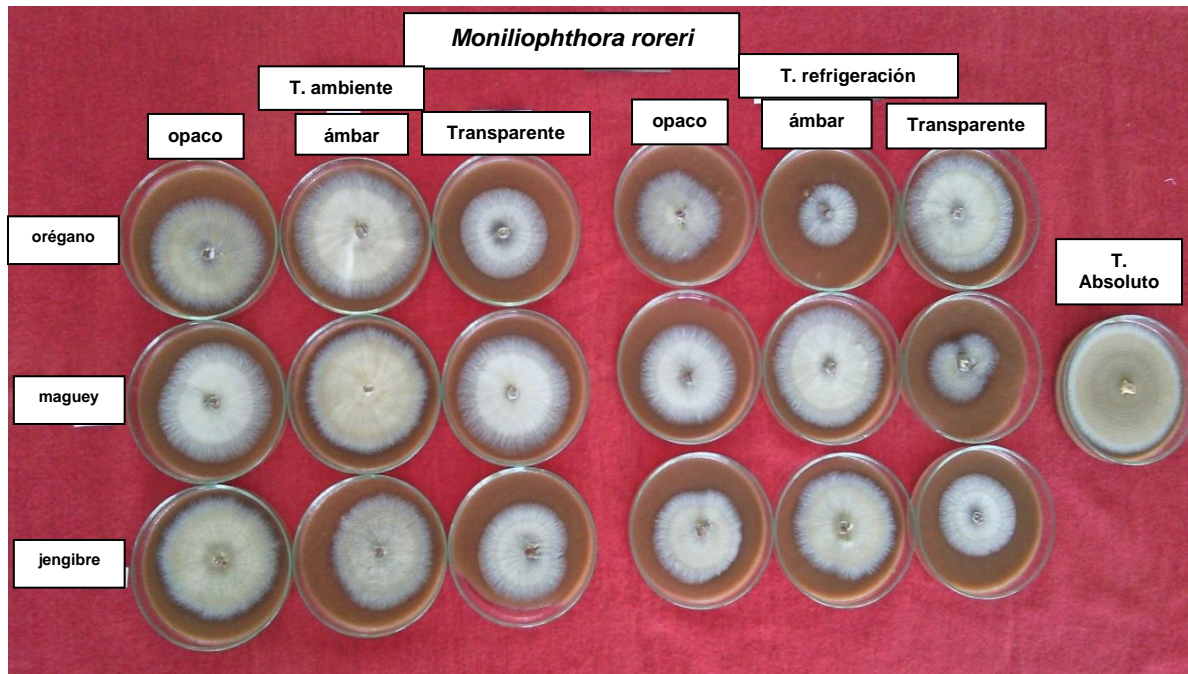


Figura 15. Aspecto del crecimiento micelial de *M. roreri* por efecto de los destilados de orégano maguey morado y jengibre a los ocho meses de su obtención.

Tal como se aprecia en el cuadro 13; para el caso del hidrolato de orégano, el tratamiento T5 (40 % v/v, temperatura de refrigeración y envase color ámbar) fue el que presentó el porcentaje más alto de inhibición del crecimiento micelial del patógeno, reportando 24.44 %, seguido de los tratamientos T3 (40 % v/v, temperatura ambiente y envase transparente) y T4 (40 % v/v, temperatura de refrigeración y envase opaco) cuyo valor en ambos casos fue de 10 % de inhibición, siendo el testigo absoluto el que presentó el mayor crecimiento micelial.

El análisis estadístico (Cuadro 5A) reporta que existen diferencias significativas entre los tratamientos, en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) las medias de todos los tratamientos registran diferencias con el testigo absoluto. El efecto del extracto de orégano a 40 % v/v evaluado en tres tipos de recipiente y a dos temperaturas sobre la formación de conidias indica que el tratamiento T5 (envase ámbar y almacenado a

temperatura de refrigeración 4 °C) presentó el valor más bajo en formación de las mismas (49.50×10^5 conidias totales $m L^{-1}$); seguido del tratamiento T4 (envase opaco, temperatura de refrigeración 4 °C) con un valor de (276.79×10^5 conidias totales $m L^{-1}$); cuyos valores se encuentran por debajo del registrado por el testigo absoluto, el cual reportó (3301.50×10^5 conidias totales $m L^{-1}$).

Respecto a las conidias germinadas, todos los tratamientos evaluados inhibieron su germinación. Por su parte el testigo absoluto alcanzó el valor más alto de germinación de conidias (15.00×10^5 conidias germinadas $m L^{-1}$). Según los datos obtenidos, el tratamiento T5 fue el que registró los mejores valores en esta etapa de evaluación, debido a que se reporta que es mejor utilizar envase ámbar y almacenar el extracto a temperatura de refrigeración 4 °C para mantener las características del hidrolato y evitar que la luz degrade los componentes activos del orégano, tal como menciona (González., *et al* 2011; citado por Colchado 2014; Millán 2008) quienes mencionan que el extracto de orégano debe colectarse en envases ámbar para prevenir la oxidación del mismo y, almacenar el extracto a 4 °C.

Guzmán *et al.* (2004), quienes evaluaron el efecto insecticida y residual de tres extractos de *Lippia alba* para el control de *Acanthoscelides obtectus* en frijol Diacol Calima, los autores mencionan que al elaborar aceites esenciales, es preferible almacenarlos en frasco color ámbar y refrigerarlo para su conservación. Según Niño *et al.* (2007), los extractos vegetales elaborados deben ser almacenados a una temperatura de -10 °C para garantizar la estabilidad de los mismos. Los autores evaluaron diferentes extractos para el control de la broca del café. Sin embargo, Landero (2013) y Lizcano (2007) mencionan que los extractos vegetales deben ser almacenados a temperatura de refrigeración (4 °C) y en envase de color ámbar hasta su utilización, esto con el fin de mantener las propiedades de cada hidrolato. Cháves (2008).

El efecto del hidrolato de maguey morado evaluado a los ocho meses de su obtención (Figura 18) sobre el crecimiento micelial del hongo mostró diferencias entre los tratamientos estudiados; es decir, el tratamiento T12 que fue almacenado en envase transparente y a temperatura de refrigeración, mostró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio (35.18 %). Por su parte, el tratamiento que inhibió solamente en un 2.58 % la inhibición del crecimiento micelial fue el T11, evaluado en envase color ámbar y almacenado a 4°C. En cuanto al conteo de conidias totales, se aprecia que el tratamiento (T12) mostró el porcentaje más alto en la inhibición de la formación de conidias, reportando 99.57 % para este tratamiento, coincidiendo con el análisis estadístico practicado que reporta que existen diferencias entre los tratamientos y el testigo absoluto, el cual registró 3301.50×10^5 conidias totales $m L^{-1}$). Por otro lado, el tratamiento T10, evaluado en envase opaco y almacenado a temperatura de refrigeración mostró inhibición en la formación de

conidias, reportando 94.87 %, a pesar de que este tratamiento únicamente inhibió en un 9.63 % el crecimiento micelial del patógeno comparado con el testigo. Todos los tratamientos presentaron diferencias con el testigo absoluto en cuanto a la germinación de conidias, únicamente el testigo registró el valor más alto (15.00×10^5 conidias germinadas $m L^{-1}$).

Cuadro 13. Efecto de los extractos de orégano, maguey morado y jengibre a los ocho meses de su obtención sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roleri*.

Codificación	Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales ($m L^{-1} \times 10^5$)	Conidias germinadas ($m L^{-1} \times 10^5$)
T1	40 % O1, T.A ¹ , opaco	87.00 d,e,f	470.50 f	0.00 a
T2	40 % O1, T.A ¹ , ámbar	85.33 d,e,f	312.62 c,d	0.00 a
T3	40 % O1, T.A ¹ , transparente	81.00 c,d,e	316.00 c,d,e	0.00 a
T4	40 % O1, T.R ² , opaco	81.00 c,d,e	276.79 c	0.00 a
T5	40 % O1, T.R ² , ámbar	68.00 b	49.50 a	0.00 a
T6	40 % O1, T.R ² , transparente	84.00 d,e,f	498.25 f	0.00 a
T7	40 % M1, T.A ¹ , opaco	84.67 d,e,f	362.73 d,e	0.00 a
T8	40 % M1, T.A ¹ , ámbar	83.33 d,e,f	824.50 h	0.00 a
T9	40 % M1, T.A ¹ , transparente	86.67 d,e,f	306.62 c,d	0.00 a
T10	40 % M1, T.R ² , opaco	81.33 c,d,e	169.36 b	0.00 a
T11	40 % M1, T.R ² , ámbar	87.67 e,f	374.79 e	0.00 a
T12	40 % M1, T.R ² , transparente	58.33 a	14.00 a	0.00 a
T13	40 % J1, T.A ¹ , opaco	86.00 d,e,f	580.00 g	0.00 a
T14	40 % J1, T.A ¹ , ámbar	81.67 c,d,e	503.41 f	0.00 a
T15	40 % J1, T.A ¹ , transparente	80.67 c,d	327.34 c,d,e	0.00 a
T16	40 % J1, T.R ² , opaco	75.67 c,d,e	173.25 b	0.00 a
T17	40 % J1, T.R ² , ámbar	82.00 c,d,e	615.37 g	0.00 a
T18	40 % J1, T.R ² , transparente	76.00 c	131.54 b	0.00 a
T19. T. Abs.		90.00 f	3301.50 i	15.00 b
CV		0.09	1.37	4.28

¹ Temperatura ambiente ² Temperatura refrigeración

Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

De acuerdo a los datos obtenidos, el tratamiento T12 mostró los mejores resultados en esta fase de evaluación, ya que en este caso el color del envase (transparente) no influye en gran medida en la efectividad del extracto de maguey morado sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias del hongo, debido a los valores registrados (35.18 % para inhibición del micelio, 99.57 % para la inhibición de conidias y 100 % para inhibición de conidias germinadas).

Según la información obtenida en el cuadro 13, el extracto de jengibre que presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue el T16, ya que reportó

15.92 % a 40 % de concentración, este tratamiento fue el que utilizó envase opaco y se almaceno a temperatura de refrigeración. Seguido del tratamiento T18 (40 % v/v, temperatura refrigeración y envase transparente) el cual registró 15.55 % de inhibición del crecimiento micelial del patógeno. Los tratamientos evaluados a temperatura ambiente presentaron porcentajes de inhibición que van del 4.44 % al 10.37 % respectivamente.

El análisis estadístico reporta diferencias entre los tratamientos, en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) las medias registran diferencias con el testigo absoluto. Es decir, para la variable de conidias totales, el tratamiento T18 (40 % v/v; envase transparente y almacenado a temperatura de refrigeración 4 °C) presentó (131.54×10^5 conidias totales $m L^{-1}$), el tratamiento que presentó el valor más alto en la formación de conidias (615.37×10^5 conidias totales $m L^{-1}$) fue el T17, utilizando envase ámbar y almacenado a temperatura de refrigeración. Sin embargo, estos valores se encuentran por debajo de los resultados registrados por el testigo absoluto, el cual reportó 3301.5×10^5 conidias totales $m L^{-1}$, respecto al número de conidias germinadas, únicamente el testigo absoluto reportó el máximo valor de esta variable (15.00×10^5 conidias germinadas $m L^{-1}$), los demás tratamientos evaluados presentaron inhibición total de germinación de conidias.

Con estos resultados, se obtiene que el tratamiento T18 fue el que presentó los mejores valores registrados para las variables de crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri*, sumado a que los compuestos activos del jengibre no se vieron afectados por el envase utilizado (transparente). Por otro lado, coincide con los demás hidrolatos (orégano y maguey) evaluados, ya que los tres extractos necesitan conservarse a temperatura de refrigeración 4 °C. Con lo cual se corrobora que la temperatura tiene efecto directo sobre la efectividad de los extractos vegetales, tal como lo mencionan Bayer *et al* (1987); reportado por Infante *et al* (2015), los metabolitos secundarios, especialmente los fenoles, pueden descomponerse parcial o totalmente a temperatura ambiente, debido a la ruptura de los anillos de benceno, los cuales son base estructural de muchos de ellos. Por su parte, Sharapin (2000) reportado por Infante *et al.* (2015), afirma que los metabolitos secundarios tienen carácter termolábil, lo cual puede estar relacionado con el efecto de la temperatura sobre la efectividad de los extractos.

La información obtenida de los extractos de maguey morado y jengibre en cuanto al color del envase utilizado (opaco, ámbar y transparente) reportan los mejores resultados sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri* al utilizar envase transparente, debido a que en ambos casos los componentes activos de cada planta no se degradan por efecto de la luz. Sin embargo esta información difiere de autores como Werdin *et al.*, (2008) quienes evaluaron la bioactividad de aceites esenciales de *Schinus molle* var. *Areira* en ninfas II de *Nezara*

viridula, los autores citaron que los aceites esenciales se almacenan en oscuridad (envases ámbar) a 4°C para su conservación, según (Murray *et al.* ,200; Tequida *et al.*; 2002).

Orozco *et al.*; 2009 evaluaron extractos de plantas sobre *Sitophilus oryzae* los autores indicaron que se debe almacenar los hidrolatos en recipientes de plástico, cubrirlos con papel aluminio y conservarlos a una temperatura de 4 °C para evitar degradación de las moléculas por efecto de la luz y la temperatura. Información que difiere con los resultados de esta investigación para los extractos de maguey morado y jengibre, ya que no fue necesario proteger el envase de la luz para conservar las características del producto; así mismo, es económico utilizar envase transparente que envase ámbar, optimizando de ésta manera la conservación de los extractos vegetales. Coincidiendo con Mathon, 2012 quien menciona que los envase de plástico son los más utilizados por ser económicos, funcionales y livianos.

4.3.3. Características (color, olor y sedimentación) de los destilados de orégano, maguey morado y jengibre a los ocho meses de almacenaje












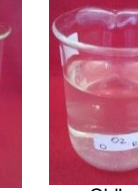













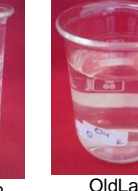


En los Cuadros 14, 15, 16, 17, 18 y 19 se detallan las características de cada destilado obtenido con *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* con respecto a su color, olor y sedimentación. Tanto en tiempo cero (al momento de la destilación) como a los ocho meses, tomando en cuenta dos condiciones de almacenaje (temperatura ambiente y temperatura de refrigeración 4°C) y tres tipos de recipiente (opaco, ámbar y transparente).

En cuanto a la coloración de cada destilado, ésta se realizó mediante la distinción de los mismos utilizando el código de colores RGB, el cual se consigue mezclando los tres colores básicos (rojo-verde-azul) que permite distinguir entre 256 niveles de intensidad, dando 16000 distintos colores. Tal como se observa, la coloración es variada, esto se puede deber a varios factores: material vegetal utilizado (orégano, maguey morado y jengibre), cantidad de material vegetal necesario para obtener cada destilado, relación agua-alcohol y; además, al estado de la planta (fresco o secado al sol). El olor que desprende cada destilado es característico de cada una de las plantas estudiadas; es de recalcar que al momento de la obtención de cada hidrolato, ninguno presentó sedimento.

Sin embargo, al pasar el tiempo establecido (ocho meses) se formó sedimento en la mayoría de los tratamientos. Para el caso del orégano, únicamente los hidrolatos que no presentaron sedimento fueron aquellos que se almacenaron en envases de color ámbar, tanto a temperatura ambiente como a refrigeración 4°C. Los hidrolatos de maguey morado que no permitieron la formación de sedimento fueron los tratamientos M1 y M2, los mismos que fueron almacenados en envase ámbar a

temperatura ambiente y los tratamientos M2 y M3 almacenados en envases color ámbar a temperatura de 4 °C. Por otro lado, los tratamientos J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7 y J8 no formaron sedimentos al utilizar envase ámbar a las dos condiciones de almacenaje evaluadas. Los demás tratamientos presentaron sedimento en escala que va de bajo, medio y alto. Se pudo observar que la cantidad de sedimento en cada hidrolato varía conforme a la temperatura de almacenaje utilizada; así como también, el tipo de recipiente (opaco, ámbar y transparente). Respecto al olor de cada hidrolato, éste se mantuvo durante el tiempo establecido (ocho meses).





























Cuadro 14. Características del hidrolato de orégano fresco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.

T	Tiempo (cero) obtención	(ocho meses)						
		opaco	T. ambiente ámbar	transparente	opaco	T. Refrigeración ámbar	transparente	
O1								
	LightYellow FFFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFFE0 ¹ característico ² bajo ³	LightYellow FFFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFFE0 ¹ característico ² bajo ³	LightYellow FFFFE0 ¹ característico ² medio ³	LightYellow FFFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFFE0 ¹ característico ² medio ³	
	O2							
		OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	LemonChiffon FFACD característico ² bajo ³	LemonChiffon FFACD característico ² ausencia ³	LemonChiffon FFACD característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³
O3								
		OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² bajo ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³
	O4							
		LightYellow FFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	LightGolden rod Yellow FAFAD2 característico ² bajo ³	LightGolden rod Yellow FAFAD2 característico ² ausencia ³	LightGolden rod Yellow FAFAD2 característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³

http://www.mclibre.org/consultar/amaya/css/css_color.html

¹ color, ² olor, ³ sedimento






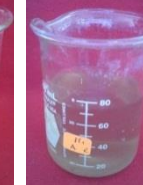




















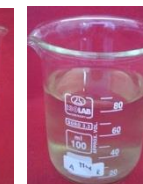

Cuadro 15. Características del hidrolato de orégano seco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.

T	Tiempo (cero) obtención	(ocho meses)					
		opaco	T. ambiente ámbar	transparente	opaco	T. Refrigeración ámbar transparente	
O5							
	Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² bajo ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³
O6							
	Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² bajo ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³
O7							
	LightGray D3D3D3 ¹ característico ² ausencia ³	Tan D2B48C ¹ característico ² medio ³	Tan D2B48C ¹ característico ² medio ³	Tan D2B48C ¹ característico ² medio ³	PapayaWhip FFEFD5 ¹ característico ² medio ³	PapayaWhip FFEFD5 ¹ característico ² ausencia ³	PapayaWhip FFEFD5 ¹ característico ² medio ³
O8							
	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³

http://www.mclibre.org/consultar/amaya/css/css_color.html

¹ color, ² olor, ³ sedimento




















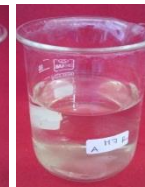








Cuadro 16 .Características del hidrolato de maguey morado fresco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.

T	Tiempo (cero) obtención	(ocho meses)					
		opaco	T. ambiente ámbar	transparente	opaco	T. Refrigeración ámbar transparente	
M1							
	Linén FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	Tan D2B48C ¹ característico ² alto ³	Tan D2B48C ¹ característico ² ausencia ³	Tan D2B48C ¹ característico ² alto ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² alto ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² medio ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² alto ³
M2							
	Linén FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	Wheat F5DEB3 ¹ característico ² medio ³	Wheat F5DEB3 ¹ característico ² ausencia ³	Wheat F5DEB3 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² alto ³
M3							
	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² medio ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² bajo ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² alto ³
M4							
	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² medio ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² medio ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² alto ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² alto ³

http://www.mclibre.org/consultar/amaya/css/css_color.html

¹ color, ² olor, ³ sedimento





























Cuadro 17 .Características del hidrolato de maguey morado seco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.

T	Tiempo (cero) obtención	(ocho meses)						
		opaco	T. ambiente ámbar	transparente	opaco	T. Refrigeración ámbar	transparente	
M5								
	Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	BurlyWood DEB887 ¹ característico ² bajo ³	BurlyWood DEB887 ¹ característico ² bajo ³	BurlyWood DEB887 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	
	M6							
		Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² bajo ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² bajo ³	LemonChiffon FFFACD ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³
M7								
		Light Yellow FFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² medio ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² medio ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³
	M8							
		Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² alto ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² alto ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² alto ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² alto ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² alto ³

http://www.mclibre.org/consultar/amaya/css/css_color.html

¹ color, ² olor, ³ sedimento





























Cuadro 18. Características del hidrolato de jengibre fresco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado.

T	Tiempo (cero) obtención	(ocho meses)						
		opaco	T. ambiente ámbar	transparente	opaco	T. Refrigeración ámbar	transparente	
J1								
	Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	Linen FAF0E6 ¹ característico ² bajo ³	Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	Linen FAF0E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	
	J2							
		Tan D2B48C ¹ característico ² ausencia ³	Tan D2B48C ¹ característico ² alto ³	Tan D2B48C ¹ característico ² ausencia ³	Tan D2B48C ¹ característico ² alto ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² alto ³
J3								
		Tan D2B48C ¹ característico ² ausencia ³	Tan D2B48C ¹ característico ² alto ³	Tan D2B48C ¹ característico ² ausencia ³	Tan D2B48C ¹ característico ² alto ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFFE0 ¹ característico ² alto ³
	J4							
		Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³

http://www.mclibre.org/consultar/amaya/css/css_color.html

¹ color, ² olor, ³ sedimento

Cuadro 19. Características del hidrolato de jengibre seco al momento de la obtención y a los ocho meses de almacenado

T	Tiempo (cero) obtención	(ocho meses)						
		opaco	T. ambiente ámbar	transparente	opaco	T. Refrigeración ámbar transparente		
J5								
	Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	
	J6							
		Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³	LightYellow FFE01 ¹ característico ² ausencia ³	LightYellow FFE01 ¹ característico ² medio ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² medio ³
J7								
		Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³
	J8							
		Linen FAF0E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² ausencia ³	OldLace FDF5E6 ¹ característico ² bajo ³

http://www.mclibre.org/consultar/amaya/css/css_color.html

¹ color, ² olor, ³ sedimento

Cuadro 20. Comparación del hidrolato de orégano al momento de su obtención y a los ocho meses de almacenaje

		Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales (m L ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias germinadas (m L ⁻¹ x10 ⁵)	color	Sedimento
orégano obtención							
O	40 %	O1	0.00	0.00	0.00	Light yellow FFFFEO	ausencia
orégano 8 meses							
T1	40 %	O1, T.A ¹ , opaco	87.00	470.50	0.00	Light yellow FFFFEO	bajo
T2	40 %	O1, T.A ¹ , ámbar	85.33	312.62	0.00	Light yellow FFFFEO	ausencia
T3	40 %	O1, T.A ¹ , transparente	81.00	316.00	0.00	Light yellow FFFFEO	bajo
T4	40 %	O1, T.R ² , opaco	81.00	276.79	0.00	Light yellow FFFFEO	medio
T5	40 %	O1, T.R ² , ámbar	68.00	49.50	0.00	Light yellow FFFFEO	ausencia
T6	40 %	O1, T.R ² , transparente	84.00	498.25	0.00	Light yellow FFFFEO	medio

¹ Temperatura ambiente ² Temperatura refrigeración

En el Cuadro 20 se presentan los datos comparativos del comportamiento del hidrolato de orégano al momento de obtención y a los ocho meses de su almacenaje. Al momento de su obtención se presentó 100 % de inhibición en el crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri* a 40 % de concentración y a los ocho meses de obtenido y embasado utilizando tres tipos de envase (opaco, ámbar y transparente) y dos temperaturas (ambiente y 4 °C). muestran que al almacenar los extractos a temperatura ambiente en los tres diferentes envases, la efectividad del hidrolato tiende a disminuir, reportando porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio que van del 3.33 al 10 %; en cuanto a la formación de conidias se reporta del 85.74 al 97.42 % de inhibición. Para los extractos de orégano almacenados a 4 °C y utilizando los tres envases, se encontró porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio del 6.66 al 24.44 %; y del 84.90 al 98.50 % de inhibición en la formación de conidias. Ningun tratamiento permitió la germinación de conidias de *M. roreri*. Respecto al color, este se mantuvo durante el tiempo establecido (ocho meses) y hubo ausencia de sedimento únicamente en el extracto al momento de la obtención y en los tratamientos evaluados en envase ámbar tanto a temperatura ambiente como a 4 °C.

Cuadro 21. Comparación del hidrolato de maguey morado al momento de su obtención y a los ocho meses de almacenaje

		Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales (m L ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias germinadas (m L ⁻¹ x10 ⁵)	color	Sedimento
maguey morado obtención							
M	40 %	M1	0.00	0.00	0.00	Linen FAF0E6	ausencia
maguey morado 8 meses							
T7	40 %	M1, T.A ¹ , opaco	84.67	362.73	0.00	Tan D2B48C	alto
T8	40 %	M1, T.A ¹ , ámbar	83.33	824.50	0.00	Tan D2B48C	ausencia
T9	40 %	M1, T.A ¹ , transparente	86.67	306.62	0.00	Tan D2B48C	alto
T10	40 %	M1, T.R ² , opaco	81.33	169.36	0.00	LemonChiffon FFFACD	alto
T11	40 %	M1, T.R ² , ámbar	87.67	374.79	0.00	LemonChiffon FFFACD	medio
T12	40 %	M1, T.R ² , transparente	58.33	14.00	0.00	LemonChiffon FFFACD	alto

¹ Temperatura ambiente ² Temperatura refrigeración

En el Cuadro 21 se compara la efectividad del extracto de maguey morado al momento de su obtención y a los ocho meses de obtenido y almacenado utilizando tres recipientes (opaco, ámbar y transparente) y dos temperaturas (ambiente y 4 °C). El extracto al momento de su obtención presentó 100% de efectividad sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri* y ausencia de sedimento. Para el caso de los tratamientos evaluados a temperatura ambiente y en tres tipos de envase a los ocho meses, se registran porcentajes de inhibición del crecimiento micelial que van del 3.70 al 6.30 %; respecto al conteo de conidias, los porcentajes van del 75.03 al 90.71 % de inhibición. Por otro lado, al almacenar a 4 °C, la efectividad de los extractos se reportó con porcentajes de inhibición del crecimiento del micelio de *M. roreri* que van del 2.59 al 35.18 %; y del 88.65 al 99.57 % de inhibición en la formación de conidias. Todos tratamientos inhibieron la germinación de conidias, De acuerdo con las observaciones realizadas en cuanto al color y olor de cada hidrolato, únicamente el tratamiento evaluado a temperatura ambiente y en envase ámbar reporto ausencia de sedimento. Sin embargo; en este caso, el tratamiento que presentó los mejores valores a pesar de que se formó sedimento en el hidrolato, fue el almacenado en envase transparente y a 4 °C.

Cuadro 22. Comparación del hidrolato de jengibre al momento de su obtención y a los ocho meses de almacenaje

		Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales (m L ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias germinadas (m L ⁻¹ x10 ⁵)	color	Sedimento
jengibre obtención							
J	40 %	J1	0.00	0.00	0.00	Linen FAF0E6	ausencia
jengibre 8 meses							
T13	40 %	J1, T.A ¹ , opaco	86.00	580.00	0.00	Linen FAF0E6	bajo
T14	40 %	J1, T.A ¹ , ámbar	81.67	503.41	0.00	Linen FAF0E6	ausencia
T15	40 %	J1, T.A ¹ , transparente	80.67	327.34	0.00	Linen FAF0E6	bajo
T16	40 %	J1, T.R ² , opaco	75.67	173.25	0.00	OldLace FDF5E6	medio
T17	40 %	J1, T.R ² , ámbar	82.00	615.37	0.00	OldLace FDF5E6	ausencia
T18	40 %	J1, T.R ² , transparente	76.00	131.54	0.00	OldLace FDF5E6	medio

¹ Temperatura ambiente ² Temperatura refrigeración

El hidrolato de jengibre al momento de su obtención, registró efectividad del 100 % en la inhibición del crecimiento del micelio y formación de conidias de *M. roseri* y su hidrolato no formó sedimento alguno. En cuanto a los tratamientos evaluados de almacenaje a temperatura ambiente utilizando tres tipos de envase a los ocho meses de obtenido el hidrolato, se reportó porcentajes del 4.44 al 10.37 % de inhibición del crecimiento micelial del hongo y, porcentajes del 82.43 al 90.08 % en la inhibición de formación de conidias de *M. roseri*. Para los tratamientos evaluados con los tres tipos de envases pero almacenados a 4 °C, se reportan porcentajes del 10 al 15.55% de inhibición del crecimiento micelial y del 81.36 al 96.01 % en inhibición de formación de conidias. Todos los tratamientos evaluados inhibieron la germinación de conidias tanto al momento de su obtención como a los ocho meses de almacenaje. El color de los tres tratamientos evaluados a temperatura ambiente se mantuvo durante el almacenaje; sin embargo, presentó sedimento al utilizar envase opaco y transparente. Al almacenar a 4 °C el color del hidrolato varió respecto a los tratamientos evaluados a temperatura ambiente y al hidrolato obtenido en el momento cero, sin embargo para el caso de la presencia de sedimento ésta se presento en diferentes niveles para las dos temperaturas evaluadas y para todos los tipos de envase, mientras que para el hidrolato al momento de su obtención no se presentó sedimento, lo cual indica que posiblemente los metabolitos presentes para éste hidrolato se degradan fácilmente.

5. CONCLUSIONES

Los hidrolatos de orégano, maguey morado y jengibre a concentraciones de 50 y 40 % obtenidos tanto de planta fresca como material secado al sol, poseen metabolitos capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento y formación de conidias de *M. roreri* en condiciones de laboratorio.

La extracción de los metabolitos de maguey morado con efectos inhibitorios en el crecimiento y desarrollo de *Moniliophthora roreri* es posible mediante la hidrodestilación utilizando únicamente agua como solvente; ya que inhibe igual que con la mezcla agua- alcohol (10:1).

Los hidrolatos de jengibre y orégano que son más eficaces en la inhibición del crecimiento y desarrollo de *Moniliophthora roreri* fueron los obtenidos con 300 g L⁻¹ (fresco), 45 g L⁻¹ y 90 g L⁻¹ (seco) con un solvente agua-alcohol (10:1).

Los hidrolatos de orégano, maguey morado y jengibre requieren para la mejor extracción de sus metabolitos alcohol y material vegetal fresco (300 g L⁻¹), siendo su concentración mínima inhibitoria de 40 %.

Los tratamientos de una parte de maguey morado y una parte de jengibre y de una parte de maguey morado y dos partes de jengibre, son los que mejor inhibieron el crecimiento y formación de conidias de *M. roreri* en condiciones de laboratorio, ya que presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del 63 y 61 % a una concentración de 30 %.

La mezcla de una parte de hidrolato de maguey morado y dos partes de jengibre a los ocho meses de su obtención, presentó los mejores resultados sobre la inhibición del crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri* al almacenar los hidrolatos en envase opaco y a temperatura de refrigeración 4 °C; ya que reportó 53.69 % de inhibición del crecimiento micelial a una concentración de 40 %.

Para la mejor conservación de los extractos de orégano, maguey morado y jengibre es indispensable almacenarlos a temperatura de refrigeración 4 °C, ya que a estas condiciones las propiedades de cada hidrolato se conservan en mayor proporción que al almacenar a temperatura ambiente. El hidrolato de orégano tuvo los mejores resultados al ser almacenado en envase ámbar, protegiendo así sus componentes activos; sin embargo, para el maguey morado y jengibre, la luz no degrada las propiedades de cada extracto, pudiendo de esta manera utilizar envase transparente para su conservación.

6. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar ensayos utilizando las diferentes partes de las plantas (tallo, hojas, raíz) con la finalidad de disminuir la concentración mínima inhibitoria de los extractos obtenidos.
2. Es recomendable secar el material vegetal a la sombra para evitar posibles contaminaciones y la pérdida de los metabolitos presentes en las plantas, a causa de la variación de temperatura y la exposición directa a los rayos solares.
3. Se recomienda determinar mediante ensayos la efectividad de la mezcla de hidrolatos utilizando proporciones diferentes a las evaluadas en la presente investigación, con el objetivo de reducir la concentración mínima inhibitoria de los extractos.
4. Es recomendable ensayar con diferentes temperaturas (congelación) y tiempo de almacenamiento (3, 6, 9 y 12 meses) para determinar los parámetros idóneos de conservación de extractos vegetales sin que exista pérdida de efectividad de los mismos.
5. El almacenamiento de extractos vegetales se puede ensayar en un lugar totalmente cerrado (refrigeración o congelación) y destinado únicamente para este fin, con el objetivo de evitar el paso de la luz a los extractos, lo cual disminuye su efectividad.

7. LITERATURA CITADA

- Aballa, A. y Rosen, J. 2001. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings, *European Food Research and Technology* 212:551-560.
- Achicanoy, H. y Buritica, P. 1981. Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer y *Moniliothora roreri* (Cif &Par) Evans *et al.* Octava Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Cartagena, Colombia. 419-423.
- Alarcón, R. E. 2008. Obtención, conservación, uso y aplicación eficiente de los extractos de plantas venenosas para el control de plagas. Universidad de Granma. Granma, Cuba. 3 p.
- Alonso, L.; Martín, C. y Slowing, K. 2012. El jengibre y la eficacia comprobada de su uso en terapéutica. *Revista Reduca*. Madrid. 4(10):78.
- Álvarez, A.; González, J. y Urquiola, A. 2008. Evaluación fitoquímica de *Erythroxylum confusum* Britt. (Erythroxylaceae) al variar el método de secado en las hojas. *Revista CENIC Ciencias Químicas*. Cuba. 39(3):135-137.
- Ampuero, C. E. 1967. Monilia pod rot of cocoa. *Growers' Bulletin*. 9:15-17.
- Angulo, A.; Kardona, E.; Lozano, A.; Montañez, K. y Salcedo, A. 2012. Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. Vol 1. Bogotá, Colombia. 87 p.
- Arguello, O. 1990. Moniliasis. En: *Memorias del Seminario Nacional de Actualización en Cacao con Énfasis en Rehabilitación de Plantaciones*. Convenio Ministerio de Agricultura e Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Manizales, Colombia. 98-110.
- Arguello, C. O. 2000. Manejo integrado de monilia en cacao (*Theobroma cacao* L.). Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Bucaramanga, Colombia. 74-84.
- Avendaño, C.; Villarreal, J.; Campos, E.; Gallardo, R.; Mendoza, A.; Aguirre, J.; Sandoval, A. y Espinosa, S. 2011. Diagnóstico del cacao en México. Primera Edición. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, México. 39 p.

- Barrera, N. y Bautista, B. 2008. Actividad antifúngica en polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*. Revista Mexicana de Fitopatología 26:27-31.
- Barros, N. O. 1980. Historia de la moniliasis y sus repercusiones en los países productores de cacao en Sudamérica. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Informe Técnico No. 28. 14-17.
- Barros, N. O. 1982. Avances en la represión de la moniliasis del cacao. Cacaotero Colombiano. 21:40-48.
- Bateman, R.; Hidalgo, E.; García, J.; Arroyo, C.; ten Hoopen, G.; Adonijah, V. y Krauss, U. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). Annals of Applied Biology 147:129-138.
- Batista, L. 2009. Guía técnica del cultivo de cacao en la República Dominicana. Centro para el Desarrollo agropecuario y Forestal (CEDAF). Santo Domingo, República Dominicana. 250 p.
- Bolívar, K.; Sanabria, M.; Rodríguez, D.; Camacaro, M.; Ulacio, D.; Cumana, L. y Crescente O. 2009. Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum goeosporioides* (Penz) Penz & Sacc. y de la antracnosis en los frutos de mango. Revista UDO Agrícola. Venezuela. 9(1):175-181.
- Brenes, O. 1983. Evaluación de la resistencia a *M roreri* y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de cacao *Theobroma cacao* L. Universidad de Costa Rica-Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 60 p.
- Cáceres, I.; Vargas, R.; Salas, E.; Muñoz, L. y Hernández, L. 2013. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. Revista Mexicana de Fitopatología 31(2):105-112
- Carrillo, Y.; Gómez, M.; Cotes, J. y Núñez, C. 2010. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio. Agronomía Colombiana 38(2):245-253.

- Centro de Comercio Internacional (CCI). Conferencia de Naciones Unidas sobre Comercio y Desarrollo UNCTAD. 2001. Cacao: Guía de prácticas comerciales. Ginebra, Suiza, 188 p.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 2010. Estudio de Mercado “Cacao Amigable con la Biodiversidad de Centroamérica”. Turrialba, Costa Rica. 198 p.
<http://www.bcienegociosverdes.com/Almacenamiento/Biblioteca/248/248.pdf>. Mayo, 2013.
- Chávez, A. 2008. Extractos vegetales con efecto fungicida, insecticida o nematocida. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 2 p.
- Colchado, S. 2014. Caracterización físico-química de complejos de inclusión β ciclodextrina, aceite esencial de orégano *Lippia graveolens* incorporado a nanopartículas poliméricas. Tesis de Maestro en Ciencias y tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 93 p.
- Correa, J., Castro, S. y Coy, J. 2014. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. Acta Agronómica 63(4):388-299.
- Crespo del Campo, E y Crespo, F. 1997. Cultivo y beneficio del cacao. CCN-51. Editor el Conejo. 133 p.
- Cruz, C.A. 1986. Evaluación de la remoción de frutos, la aplicación de fungicidas y la polinización artificial sobre la incidencia de moniliasis y la producción de cacao. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica. Universidad Nacional de Costa Rica. San José, Costa Rica. P.14-47.
- Cruz M. y Sánchez R. 2004. El árbol de nim, establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. San Luis Potosí, México. 33 p.
- Cubillos, Z. y F. Aranzazu. 1979. Comparación de tres frecuencias de remoción de frutos enfermos en el control de *Monilia roreri*. El Cacaotero Colombiano 8:27-34.
- Desroiser, R.; Von Buchwald, A. y Bolaños, C. 1955. Effect of rainfall on the incidence of *Monilia* pod rot in Ecuador. FAO. Plan Protection Bulletin 3(2):161-164.

- Desroiser, R y Díaz, J. 1957. The world distribution of diseases of cacao. En Conferencia Interamericana de cacao, Salvador, bahía, Brazil. Pp. 331-344.
- Desroisers, R y Suárez, C. 1974. Monilia Pod Rot of Cacao. In Gregory P.H. Phytophthora diseases of cocoa. Logman Group. London. Pp. 273-277.
- Díaz, O., Aguilar, J., Rendón, R. y Santoyo V. 2013. Situación actual y perspectivas de la producción de cacao en México. Ciencia e Investigación Agraria 40(2):279-289.
- Domínguez, M. 2004. Actividad antimicrobiana y eludación estructural de los metabolitos presentes en maguey morado (*Rhoeo discolor* L Hér Hance) Revista de investigación y Difusión Científica. México. 8(3):4.
- Enríquez, G. 2004. Cacao orgánico. Guía para productores ecuatoriano. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito, Ecuador. 35-37.
- Enríquez, G y Suárez, C. 1978. Monilia disease of cocoa in Costa Rica. Turrialba, Costa Rica. 28:339-340.
- Espinosa, R.; Herrera, L.; Bravo, L.; Hernández, M.; Torres, S.; Ramos, Y. y Espinosa M. 2012. Efecto sinérgico de taninos y flavonoides presentes en *Terminalia catappa* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* K y *Sclerotium rolfsii* S. Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal. Cuba. 16(1):27-32.
- Evans, H., Stalpers, J., Samson, R. y Benny, G. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Canadian Journal of Botany 56:2528-2532.
- Evans, H.C. 1980. Pleomorphism in *Crinipellis perniciosus*, causal agent of witches' broom disease of cocoa. Trans. Br.Mycol. Soc. 74:515-523.
- Evans, H. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora (Monilia) roreri*. Phytopathological Papers 24:1-44.
- Evans, H. 2002. Invasive neotropical pathogens of tree crops. In: Tropical Mycology Volume 2 Micromycetes. Watling, R.; Frankland, J.; Ainsworth, A.; Isaac, S. and Robinson, C. (Eds.). CABI Publishing. Wallingford, U.K. pp. 98-105.
- Evans, H., Holmes, K. y Reid, A. 2003. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. Plant Pathology 52:476-485.

- Evans, H. C. 2007. Cacao diseases-The trilogy revisited. *Phytopathology* 97:1640-1643.
- Estrada, A.; Gutiérrez L. y Montoya O. 2005. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad Nacional Agraria de Medellín. Medellín, Colombia.* 58:2601-2609.
- Falconí, C.; Yáñez, V.; Oleas, A.; Landázuri, P.; Giacometti, J.; Taco, M.; Peralvo, D. y Saavedra, L. 2005. Validación de biopesticidas para el control biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par Evans *et al.*) en cacao fino de aroma variedad Tenguel-25. In: *Producción Científica 2005. Edi Espe. Sangolquí, Ecuador.* 17-19.
- Flood, J y Murphy, R. 2004. *Cocoa futures: A source book of some important issues facing the cocoa industry.* CABI-FEDERACAFE, USDA. 164 p.
- Fondo Nacional del Cacao. 2011. *Campaña contra la moniliasis del cacao.* Federación Nacional de Cacaoteros, Fondo Nacional del Cacao. Bogotá, Colombia. 22 p.
- FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola). 2003. *Identificación y control de la moniliasis del cacao.* Cortés, Honduras. 24 p.
- García E.; Quezada, M.; Moreno, J.; Sánchez, G.; Moreno, E. y Pérez, M. 2006. Actividad Antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera *Carya illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(1):8-12.
- García, O.; Macedo, J.; Tibúrcio, R. y Zapparoli, G. 2007. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches broom in *Theobroma cacao*. *Mycol.* 111: 443-455.
- García, E.; Castro, F.; Gutiérrez, J. y García, S. 2012. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3(2):339-353.
- García, M.; Grespan, R.; Yumie, C.; Días, F.; Galerani, S.; Silva, E.; Alves, B.; Graton, J. y Machinski, M. 2013. Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. *Food Chem.* 141:3147-3152.

- Gliessman, S. 2002. Agroecología: Procesos ecológicos en agricultura sostenible. Turrialba, Costa Rica. 369 p.
- Gong, F.; Fung, Y. y Liang, Y. 2004. Determination of volatile components in Ginger using gas chromatography-mass spectrometry with resolution improved by data processing techniques. J. Agric. Food Chem. 52:6378-6383.
- González, L. C. 1982. Epifitiología y combate de la moniliasis del cacao. Universidad de Costa Rica. Facultad de Agronomía. Informe anual de proyecto de investigación. San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica. 21 p.
- González, L., Sánchez, A., Porras, V., Umaña, S. y Murillo, D. 1983. Evaluación del fungicida clorotalonil y de la destrucción de mazorcas enfermas en el combate de la moniliasis del cacao. Agronomía Costarricense 7(1/2):1- 7.
- Guzmán, S.; Tróchez, A.; Correa, L. y Zúñiga M. 2004. Efecto insecticida y residual de tres extractos de *Lippia alba* para el control de *Acanthoscelides obtectus* en frijol Diacol Calima. Revista Científica Guillermo de Ockham. Cali, Colombia. 13 p.
- Hernández, L.; Bautista, B. y Velázquez, V. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades en poscosecha. Revista Fitotecnia Mexicana 30(2):119-123.
- Hidalgo, E., Bateman, R., Krauss, U., Hoopen, M. y Martinez, A. 2003. A field investigation into delivery systems for agents to control *Moniliophthora roreri*. European Journal of Plant Pathology 109(9):953–961.
- Hinojosa, V.; Stoian, D, y Somarriba, E. 2003. Los volúmenes de negocios y las tendencias de precios en los mercados de cacao (*Theobroma cacao*) y banana orgánico (*Musa AAA*). Agroforestería en las Américas. Costa Rica. 10(37):37-38.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2006. Protocolo estandarizado de oferta tecnológica para el cultivo de cacao en Perú. Lima, Perú. 73 p.
- Jasso, D.; Hernández, C.; Angulo, S.; Rodríguez, G, Villareal, Q. y Lira S. 2007. Antifungal activity *in vitro* of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. Industrial Crops and Products 25(2):111-116.

- Jaimes, Y y Aranzazu F. 2010. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria (CORPOICA). Colombia. 90 p.
- Jiménez, J., Galindo, J., Ramírez, C. y Enríquez, G. 1987. Evaluación del combate biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica. Actas de la Décima Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Santo Domingo, República Dominicana. 1-7 p.
- Johnson, J., Bonilla, J. y Agüero, L. 2008. Manual de manejo y producción del cacaotero. León, Nicaragua. 40 p.
- Koksal, O; Gunes, E.; Orkan, O. y Ozden, M. 2010. Analysis of effective factor on information sources at Turkish oregan farms. African J. Agric. Res. 5:142-149.
- Krauss, U., Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., y Portuguez, A. 2003. Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. Agroforestería en las Américas 10:37-38.
- Landero-Valenzuela N. 2013. Extractos vegetales y *Trichoderma* spp. en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) y Sacc. en frutos de papaya maradol (*Carica papaya* L) en postcosecha. Tesis Doctora en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 78 p.
- Leandro, M. 2011. Efecto de los factores macro y microclimáticos y las características productivas del cacao sobre la epidemiología de la moniliasis. Tesis de Maestría en Ciencias en Agricultura Ecológica. Centro Agrónomo Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 87 p.
- Lizcano, M. 2007. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Trabajo de Grado. Pontífica Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 71 p.
- López, G y Enríquez, V. 1980. Presencia de *Monilia roreri*. En el cacao, *Theobroma cacao* L. en la frontera de Costa Rica, Managua, Nicaragua. Ministerio de Desarrollo Agropecuario. 150 p.

- López, O., González, O., Lee, V., Alvarado, A., Ramírez, S., Ramírez, M., Méndez, J. y Gehrke, M. 2006. Diagnóstico y técnicas para el manejo de la moniliasis del cacao. Universidad Autónoma de Chiapas, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Impreso Digital. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 40 p.
- López, O.; Ramírez, S.; Ramírez, M.; González, O.; Espinosa, S. y Villarreal, J. 2009. Extractos de *Thymus vulgaris* y *Heliotropium indicum* sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* (Butler) en *Theobroma cacao* L. Revista Quehacer Científico de Chiapas 1(8):54-51.
- López, O.; Ramírez, S.; Espinosa, S.; Moreno, J.; Ruíz, C.; Villarreal, J., y González, O. 2015. Comportamiento de la moniliasis del cacao *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. Acta Agrícola y Pecuaria. 1(1):16.23.
- Lozada B., Herrera, L., Perea, J., Stashenko E. y Escobar, P. 2012. Efecto *in vitro* de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta Agronómica 61 (2): 102 – 110.
- Luna, L. y Lara, G. 2007. Alelopatía y extractos vegetales: Alternativas para el manejo de insectos plagas y enfermedades en cultivos. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Colombia. 21 p.
- Marti, J., Galindo, J., Ramírez, C., Enríquez, G. 1987. Evaluación del combate biológico y químico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica. Décima Conferencia Internacional de investigación en cacao. Santo Domingo, República Dominicana. 453-497.
- Mathon, Y. 2012. Envases y embalajes. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. Primera edición. Argentina. 23 p.
- McLaughlin, H. 1950. Observation on cacao in Perú. Cacao Information Bulletin. Perú. 2:3-4.
- Mejía, A, y C. Arguello. 2000. Manejo integrado de la monilia en cacao (*Theobroma cacao* L.) en Santander. Convenio Corpoica Regional 7. Ministerio de Agricultura, Bucaramanga. Colombia. 144 p.

- Meléndez, L. 1993. Microambiente, cantidad de esporas en el aire e incidencia del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et al, bajo tres sistemas de manejo de sombra leguminosa en cacao (*Theobroma cacao* L). Tesis de Magister Scientiae en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 98 p.
- Mendoza, C 2013. El cultivo de cacao: Opción rentable para la selva. Perú. Equipo técnico del programa selva central 48 p.
- Merchan, M. V. 1980. Avances en la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. In: Enríquez, G.A. (edit.) 1982. La moniliasis del cacao. Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. Serie técnica: Informe técnico No. 28. 63 p.
- Meza, S. C. R., y León, V. 1972. Control químico de la moniliasis y mancha de agua del cacao. Revista de la Facultad de Agronomía (Venezuela) 2(1):17.
- Millán, C. 2008. Las plantas: Una opción saludable para el control de plagas. Red de Acción en Plaguicidas y sus alternativas para América Latina. Montevideo, Uruguay. 101 p.
- Montes, R.; Cruz, V.; Martínez, G.; Sandoval, G.; García, R.; Zilch, S.; Bravo, L.; Bermúdez, K. y Flores-H. 2000. Propiedades antifúngicas en plantas superiores: Análisis retrospectivo de investigaciones. Revista Mexicana de Fitopatología 18(2):125-131.
- Moreira, F. 2006. Estructura genética de populações de *Crinipellis pernicioso* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR. Sao Paulo, Brasil. 117 p.
- Morton, J. 1968. Medicinal plants old and new Bulletin of the Medical Library Association. 56(2):161-167.
- Muller, A. 1941. El reconocimiento de las enfermedades de las plantas cultivadas de Venezuela. Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales. Venezuela. 8:99-113.
- Murillo, D y González, L. 1984. Evaluación en laboratorio y campo de fungicidas para el combate de la moniliasis del cacao. Agronomía Costarricense 8:83-89.

- Nguefack, J.; Leth, V.; Amvam, P. y Marthur, S. 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mucotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 329-334.
- Niño, J.; Bustamante, A.; Correa, Y. y Mosquera O. 2007. Evaluación de extractos vegetales para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei*, Ferrari. Recursos Naturales y Ambiente. Comunicación Técnica. Pereira, Colombia. 383-385.
- Ocampo, B.; Ríos, E. y Soria, L. S. 2012. La producción de cacao en México. Facultad de Ciencias Agrícolas. UNuversidad Nacional de México. 47 p.
- Ochoa, L. 2014. Preparados minerales en el manejo orgánico de la moniliasis *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans *et al.* de *Theobroma cacao* L en el municipio de Tecpatán Chiapas, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chiapas. Chiapas, México. 69 p.
- Ochoa, L.; Ramírez, S.; López, O.; Moreno, J. y Espinosa, Saúl. 2015. Efecto de preparados minerales sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(5):1065-1075.
- Ogata, N. 2007. El cacao. *Biodiversitas* 72: 1–5.
- Orbe, P.; Tuesta, G.; Merino, C.; Rengifo, E. y Cabanillas, B. 2013. Evaluación de la actividad alelopática de cinco especies vegetales amazónicas. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Perú. 22(1-2):91-96.
- Orellana, R. 1956. La moniliasis y otras enfermedades del cacao en el este de Panamá. *Boletín Fitosanitario FAO* 4:168-169.
- Orozco, C.; Guerrero, E.; Landeros, J.; García, M.; Mendoza, R. y Lira, R. 2009. Actividad biológica *in vitro* de extractos de plantas del Sureste de Coahuila, México, contra *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Agraria Nueva Época*. Volumen 6. Monterrey, México. 25-30 p.
- Palencia C. G. E. y Mejía F. L. A. 2003. Producción masiva de materiales clonales de cacao *Theobroma cacao* L. Manual técnico. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Bucaramanga, Colombia. 58 p.

- Peña, Z.; Muñoz, G. y Vargas, N. 2004. Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento micelial del hongo *Thielaviopsis paradoxa* en piña. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, Venezuela. 21(1):188-192.
- Phillips, W, 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Ph.D. Thesis. University of Reading, UK. 349 p.
- Phillips, W. 2004. La moniliasis del cacao: Una seria amenaza para el cacao en México. Simposio Nacional de Manejo Fitosanitario de Cultivos Tropicales. Villahermosa, Tabasco. México. 91-99.
- Phillips, W.; Castillo, J.; Krauss, U.; Rodríguez, E. y Wilkinson, J. 2005. Evaluation of cacao (*Theobroma cacao* L) clones against seven Colombia isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. Plant Pathology 54:483-490.
- Phillips, W. 2006. La moniliasis del cacao: Un enemigo de podemos y debemos vencer. Taller regional Andino de aplicación tecnológica en el cultivo de cacao. Quevedo, Ecuador. 21-25.
- Phillips, W. y Wilkinson, M. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. Phytopathology 97:1644-1647.
- Pinzón U. y Rojas A. 2004. Guía técnica para el cultivo de cacao. Federación Nacional de Cacaoteros en Colombia. Bogotá, Colombia. 187 p.
- Porras, H. y Enríquez, G. 1998. Spread of monilia pod rot of cocoa through Central America. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 20 p.
- Programa para el desarrollo de la Amazonía (PROAMAZONÍA). 2003. Caracterización de las zonas productoras de cacao en el Perú y su competitividad. Ministerio de Agricultura. Lima, Perú. 208 p.
- Pupo, Y.; Bicayi, D.; Herrera, L.; Malheiros, D. y Vargas, B. 2011. Efecto de extractos vegetales en el crecimiento y germinación de esporas de *Alternaria solani* (E. & M.) J. & G. en condiciones *in vitro*. Revista Iberoamericana de Micología 28(1):60.

- Purdy, H. 1999. Fungal diseases of cacao. In: U Krauss, P. Hebbar. Research methodology in biocontrol of plant diseases with special reference to fungal diseases of cocoa. Workshop manual. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 7-18 p.
- Quevedo, I. 2012. Evaluación de fungicidas sistémicos y de contacto en el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Texcoco, México. 72 p.
- Quintero, M y Díaz, K 2004. El mercado mundial de cacao. Agroalimentaria. Venezuela. 9(18):47-49.
- Ramírez, S. y López, O. 2006. El manejo orgánico integral de insectos plagas y enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L) In: López, B.; Ramírez, S.; Ramírez, M.; Moreno, G. y Alvarado, A. (ed) (2006). Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Primera edición. Editorial UPTC-UNACH. Tunja, Boyacá, Colombia. Pp. 240-264.
- Ramírez, S. 2008a. La moniliasis: Un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. Revista Tecnología en Marcha. Huehuetán, Chiapas, México. 21(1):97-110.
- Ramírez, S. 2008b. Extractos vegetales para el manejo orgánico de la mancha negra (*Phytophthora palmivora*) del cacao (*Theobroma cacao*). Tesis Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México. 92 p.
- Ramírez, S.; López, O.; Guzmán, T.; Munguía, S. y Espinosa, S. 2011a. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et al. Revista Tecnología en Marcha. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 24(2):3-17.
- Ramírez, S., López, O., Guzmán, T., Munguía, S. y Moreno, J. 2011b. El polisulfuro de calcio en el manejo de la moniliasis *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). Evans et al. del cacao *Theobroma cacao* L. Tecnología en Marcha País? 24(4):10-18.
- Ramírez, S 2013. Efectividad de extractos vegetales en el manejo de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L) en México. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Costa Rica. Heredia, Costa Rica 162 p.

- Reyes, A.; Ezúara, E.; Beristain, C.; Cruz, F. y Vernon, E. 2009. Propiedades antioxidantes de maguey morado (*Rhoeo discolor*). CyTA Journal of food. 7(3):209-216.
- Reyes, L. y Marín, C. 1981. Un método de evaluación de antiesporulantes a *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans. Octava Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Colombia. Pp. 429-431.
- Reyes, A.; Castro, H.; Rodríguez, L.; Quijano, C. y Parada, F. 2011. Obtención de extractos de jengibre (*Zingiber Officinale* R.) empleando CO₂ supercrítico. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colombia. 35(136):381-385.
- Rivero, I.; Duarte, G.; Navarrete, A.; Bye, R.; Linares, E. y Mata, R. 2011. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomntha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. J. Food Sci. 17:C309-C317.
- Rorer, J. 1918. Enfermedades y plagas del cacao en Ecuador y métodos modernos apropiados al cultivo de cacao. Asociación de Agricultores. Guayaquil, Ecuador. 17-40.
- Sánchez, I. J. A. 1982. Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con *Monilia roreri*. Tesis M. Sci., Universidad de Costa Rica - Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 55 p.
- Sánchez, F., Gamboa, E. y Rincón, J. 2003. Control químico y cultural de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao* L) en el estado de Barrinas. Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia. Venezuela. 20(2):188-194.
- Sánchez, H. 2011. Determinación de la actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)-B-glucanasa y amplificación endo-1,3(4)-B glucanasa a partir de *Moniliophthora roreri*. Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tabasco, México. 100 p.
- Sánchez, F y Gárces, F. 2012. *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans *et al.* en el cultivo de cacao. Scientia Agropecuaria. Ecuador. 3:249-258.
- Sarukhan, J. 1995. Diversidad biológica. Revista Universidad de México. México. 536:3-10.

- Sandoval, G.A.; Armbrecht, H. y Granada, G. 1987. Posibilidad de control biológico de la moniliasis del cacao. Actas de la 10ª Conferencia internacional de investigación en cacao. Santo Domingo, República Dominicana. Pp. 473-477.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (SAGARPA) Servicio de información agroalimentaria y pesquera. (SIAP). 2014. Producción agrícola. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/index>.
- Sivasothy, Y.; Keng, W.; Hamid, A.; Eldeen, I.; Farizza, S. y Awang, K. 2011. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *Rubrum* Theilade and their antibacterial activities. Food Chemistry 124:514-517.
- Soberanis, W.; Arévalo, E.; Zúñiga, L.; Cabezas, O. y Krauss, U. 1999. Increased frequency of phytosanitary pod removal in cacao (*Theobroma cacao* L) increases yield economically in Eastern Peru. Crop Protection 18:677-685.
- Suárez, C. 1971. Estudio del mecanismo de penetración y del proceso de infección de *Monilia roreri* Cif y Par. en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis Ingeniería Agropecuaria. Universidad de Guayaquil. Ecuador. 59 p.
- Suárez, C. 1979. Las enfermedades del cacao en Latinoamérica. Proceedings 7ª Conferencia Internacional de investigación en Cacao. Douala, Cameroun. Pp. 251-254.
- Suárez, C. 1980. El problema de la moniliasis y su combate en el Ecuador. In Enríquez, G.A. (Eds.). La moniliasis del cacao. CATIE. Serie Técnica. Turrialba, Costa Rica. Pp. 70-78.
- Suárez, L. 2006. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del nororiente colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. Colombia. 11(1):3-8.
- Suárez, L y Rangel, A. 2013. Aislamientos de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri* Acta Agronómica. Colombia. 62:370-378.
- Suárez, L y Rangel, A. 2014. Aislamientos de microorganismos para control de *Moniliophthora roreri*. Acta Agronómica. Cúcuta, Colombia. Pp. 370-378.

- Tequida, M.; Cortez, M.; Rosas, E.; López, S. y Corrales C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. Revista Mexicana de Micología. 19:84-88.
- The International Cocoa Organization (ICCO). 2006. A study on the market for organic cocoa. Executive committee. One hundred and thirtieth meeting. London. 12 p.
- Thévenin, J. M. Trocmé, O. 1996. La moniliasis del cacao. Plantations, recherche, développement 3(6):403-406.
- Toledo, V. 1994. La diversidad biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventa. Ciencias. México. 34: 43-59.
- Torres, M. 2010. Progreso temporal y manejo integrado de la moniliasis del cacao en Tabasco, México. Tesis Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 86 p.
- Vázquez, O.; Alba, A. y Marreros, J. 2001. Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber Officinale* R). Rev. Amaz. Inv. Alim. 1:38-42.
- Vergara, R. 1994. Investigación sobre extractos de plantas con propiedades insecticidas. Memorias: Primer Seminario Nacional de plantas aromáticas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. Pp. 48-60.
- Vergara, R. 1997a. De la agricultura tradicional a la agricultura biológica. Memorias Seminario Regional. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Villamil, J., Blanco, J. y Viteri, Silvio. 2012. Evaluación *in vitro* de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao (*Theobroma cacao* L). Revista Facultad Nacional de Agronomía. Colombia. 65(1):6305-6315.
- Villa, M. 1999. Potencial de extractos vegetales. Aconteceres entomológicos. Segundo Seminario. Medellín, Colombia. p. 32-40.
- Villa, A.; Pérez, R.; Morales, H.; Basurto, M.; Soto, J. y Martínez, E. 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. Acta Agronómica. Universidad Autónoma de Chihuahua. México. 64(2):194-205.

- Viveros, J y Castaño, J. 2006. Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Colombia. Agron. 14(1):37-50.
- Waizel, S., Waizel, J., Magaña, J., Campos, P. y San Esteban, J (2012). Cacao y chocolate: seducción terapéutica. Revista de la Asociación Médica. Trabajo de revisión. México. 57(3):236-245.
- Werdin, J.; Murray, A. y Ferrero, A. 2008. Bioactividad de aceites esenciales de *Schinus molle* var. *Areira* (Anacardiaceae) en ninfas II de *Nezara viridula* (Hemiptera: *Pentatomidae*). Boletín de Sanidad Vegetal Plagas. Argentina. 34:367-375.

8. APÉNDICE

Cuadro 1A. Análisis de varianza de la variable de crecimiento micelial de *M. roreri*.

ANOVA

		Suma de cuadrados	df	Cuadrados medios	F	Sig.
	Entre grupos	77726.911	41	1895.778	399.612	.000
O	Dentro de grupos	597.750	126	4.744		
	Total	78324.661	167			
	Entre grupos	80926.643	41	1973.821	777.192	.000
M	Dentro de grupos	320.000	126	2.540		
	Total	81246.643	167			
	Entre grupos	58558.476	41	1428.256	120.174	.000
J	Dentro de grupos	1497.500	126	11.885		
	Total	60055.976	167			

O = orégano

M = maguey morado

J = jengibre

Cuadro 2A. Análisis de varianza de las variables número de conidias (totales y germinadas) m L⁻¹ de *M. roreri*

ANOVA

		Suma de cuadrados	df	Cuadrados medios	F	Sig.
	Entre grupos	16389887830274524.000	40	409747195756863.100	36.684	.000
OT	Dentro de grupos	915908206018518.500	82	11169612268518.518		
	Total	17305796036293042.000	122			
	Entre grupos	1373669546070.460	40	34341738651.762	4.671	.000
OG	Dentro de grupos	602881944444.444	82	7352218834.688		
	Total	1976551490514.905	122			
	Entre grupos	12825982158978176.000	41	312828833145809.200	39.524	.000
MT	Dentro de grupos	664854861111111.000	84	7914938822751.321		
	Total	13490837020089288.000	125			
	Entre grupos	1365046027072.666	41	33293805538.358	4.596	.000
MG	Dentro de grupos	608483537037.333	84	7243851631.397		
	Total	1973529564110.000	125			
	Entre grupos	15667096680799280.000	40	391677417019982.000	49.474	.000
JT	Dentro de grupos	649185331902779.900	82	7916894291497.315		
	Total	16316282012702060.000	122			
	Entre grupos	1297682347177.496	40	32442058679.437	4.435	.000
JG	Dentro de grupos	599826125000.667	82	7314952743.911		
	Total	1897508472178.162	122			

OT = orégano total

OG = orégano germinado

MT = maguey morado total

MG = maguey morado germinado

JT = jenibre total

JG= jenibre germinado

Cuadro 3A. Análisis de varianza de las variables: crecimiento micelial (mm) y número de conidias (totales y germinadas) m L⁻¹ de *M. royeri*

ANOVA

		Suma de cuadrados	df	Cuadrados medios	F	Sig.
	Entre grupos	30003401181236400.000	16	1875212573827270.000	3.075	.003
CT	Dentro de grupos	20731636944444400.000	34	609754027777778.000		
	Total	50735038125680800.000	50			
	Entre grupos	397952069716.776	16	24872004357.299	6.698	.000
CG	Dentro de grupos	12625000000.000	34	3713235294.118		
	Total	524202069716.776	50			
	Entre grupos	19162.824	16	1197.676	113.958	.000
CREC	Dentro de grupos	357.333	34	10.510		
	Total	19520.157	50			

CT = conidias totales
CG = conidias germinadas
CREC = crecimiento

Cuadro 4A. Análisis de varianza de las variables: crecimiento micelial (mm) y número de conidias (totales y germinadas) m L⁻¹ de *M. rozeri*

ANOVA

		Suma de cuadrados	df	Cuadrados medios	F	Sig.
CREC	Entre grupos	3224.453	24	134.352	10.188	.000
	Dentro de grupos	659.333	50	13.187		
	Total	3883.787	74			
CTMJ	Entre grupos	2.255E16	24	9.397E14	2504.419	.000
	Dentro de grupos	1.876E13	50	3.752E11		
	Total	2.257E16	74			
CGMJ	Entre grupos	7.200E11	24	3.000E10	.	.
	Dentro de grupos	.000	50	.000		
	Total	7.200E11	74			

CTMJ = conidias totales, maguey-jengibre

CGMJ = conidias germinadas maguey-jengibre

CREC = crecimiento

Cuadro 5A. Análisis de varianza de las variables: crecimiento micelial (mm) y número de conidias (totales y germinadas) m L⁻¹ de *M. royeri*

ANOVA						
		Suma de cuadrados	df	Cuadrados medios	F	Sig.
CREC-OMJ	Entre grupos	3009.053	18	167.170	32.632	.000
	Dentro de grupos	194.667	38	5.123		
	Total	3203.719	56			
CT-OMJ	Entre grupos	2.696E17	18	1.498E16	3917.555	.000
	Dentro de grupos	1.453E14	38	3.823E12		
	Total	2.697E17	56			
CG-OMJ	Entre grupos	6.395E12	18	3.553E11	.	.
	Dentro de grupos	.000	38	.000		
	Total	6.395E12	56			

CREC-OMJ = crecimiento (orégano, maguey y jengibre)

CT-OMJ = conidias totales (orégano, maguey y jengibre)

CGMJ= conidias germinadas (orégano, maguey y jengibre)