

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et ál.

Fecha de recepción: 10/05/2010

Fecha de aceptación: 27/09/2010

Sandra Ramírez González¹
Orlando López Báez²
Tomás Guzmán Hernández³
Sayra Munguía Ulloa⁴
Saúl Espinosa Zaragoza⁵

Palabras clave

Fungicida, formas de extracción, agricultura orgánica, cacao, extractos vegetales.

Resumen

La moniliasis del cacao ocasionada por *Moniliophthora roreri* origina grandes pérdidas en los países donde se ha estado dispersando; en México, de reciente ingreso ha afectado drásticamente la producción, ya que daña los frutos en sus diferentes estados y son escasas las medidas de control que se han podido implementar, por lo que se investigó el efecto *in vitro*

de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *M. roreri*. Se aisló el hongo de frutos enfermos y se cultivó en laboratorio, las plantas fueron recolectadas y sometidas a cuatro formas de extracción: hidrolato por destilación, presurizado, fermentación aeróbica y anaeróbica. Dichos extractos se incorporaron al medio de cultivo al 50% (V/V), se sembró el hongo y se incubó durante 12 días, cuantificando el crecimiento diario y la formación de conidias; a los extractos que inhibieron totalmente al hongo se les determinó la concentración mínima

1. Ingeniera agrónoma. Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Tel: 25 9612150611. México. Correo electrónico: sanirg@yahoo.com
2. Ingeniero agrónomo. Doctor en Ciencias Biotecnología. Universidad Autónoma de Chiapas, Consorcio en Ciencias Agropecuarias, Boulevard Laguitos No. 338, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Tel: 52 9616178000 ext 1722. Correo electrónico: olopez_baez@hotmail.com
3. Ingeniero agrónomo. Doctor en Ciencias. Instituto Tecnológico de Costa Rica Apartado: 223-21001, Alajuela, San Carlos, Ciudad Quesada. Correo electrónico: tiguzman@itcr.ac.cr
4. Ingeniera agrónoma. Doctora en Ciencias. Escuela de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: smunguia@una.ac.cr
5. Ingeniero agrónomo. Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas, Huehuetán, Chiapas, México. Tel: 52 9621218465. Correo electrónico: saulez1@yahoo.com.mx

inhibitoria. Los resultados muestran que las tres plantas presentan metabolitos con efectos de inhibición sobre el crecimiento y producción de conidias, siendo el hidrolato por destilación la forma más eficiente. Los hidrolatos de *O. vulgare* L. y *T. spathacea* al 50% y el de *Z. officinale* al 30% inhibieron completamente el patógeno.

Key words

Fungicide, shape extraction, organic agriculture, cocoa, vegetable extracts.

Abstract

The frosty pod rot disease (*moniliasis*) of cacao caused by *Moniliophthora roreri* has caused great losses in countries where it has been dispersed. The recent entry into Mexico has caused serious damage in the production, since it directly affects the results in different states and a few control measures have been able to be implemented; as a result the in vitro effect of extracts of *Origanum vulgare* L was investigated, *Tradescantia spathacea* Swartz and *Zingiber officinale* Roscoe on *M. roreri*. The fungus was isolated from diseased fruits and cultivated in the laboratory; the plants were harvested and subjected to extraction in four ways: Hydrolat by distillation, pressure, anaerobic and aerobic fermentation.

These extracts were added to the culture medium at 50% (V/V), the fungus was sewn and incubated for 12 days with daily measuring of growth and the formation of conidia. The minimum inhibitory concentration of the extracts which inhibited the fungus was determined. The results show that the three plants have metabolites which affect growth and production of conidia, with Hydrolat by distilling being the most efficient method of preparation Hydrolates of *O. vulgare* L. and *T. spathacea* at 50% and *Z. officinale* at 30% completely inhibited the pathogen.

Introducción

La moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora (M. roreri)* en condiciones naturales ataca únicamente a los frutos en cualquier etapa de desarrollo, siendo los frutos de cero a tres meses de edad los más susceptibles. Externamente, los síntomas son variados, como deformaciones, mosaicos y manchas color chocolate; además, sobre la superficie del fruto se puede desarrollar un micelio blanco y, posteriormente, la producción y maduración de sus esporas, el cual puede llegar a cubrirlo totalmente y, con el paso del tiempo, se presenta la momificación; el necrosamiento del tejido de los frutos se da del interior al exterior, dañándose por completo las semillas, por lo que este patógeno puede ocasionar pérdidas totales de la producción (Evans, 1986; López *et ál.*, 2006).

La moniliasis del cacao tiene su centro de origen en Colombia y se ha diseminado a 11 países productores de cacao del sur y del centro de América (Phillips y Wilkinson, 2007). A principios del 2005 fue detectada por primera vez en México (Phillips *et ál.*, 2006) y actualmente está diseminada en las principales regiones productoras de cacao del país, dejando a su paso el derribo de gran número de hectáreas sembradas, abandono de plantaciones, bajas considerables de la producción, aumento de costos de producción, baja rentabilidad del cultivo, empobrecimiento de los productores y deterioro ambiental (Ramírez, 2008).

En el 2010, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó que del 2001 al 2009 la producción de cacao en México disminuyó en un 47%, de 46700 a 24700 toneladas, principalmente ocasionada por el ingreso de este patógeno y su rápida diseminación al 95% de la superficie sembrada en México, lo cual ha generado un fuerte desabasto de material prima para la industria chocolatera.

El manejo de esta enfermedad se basa en la integración de prácticas agronómicas como 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.

El manejo de esta enfermedad se basa en la integración de prácticas agronómicas como 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 (Federación Nacional de Cacaoteros, 2004; López *et ál.*, 2006).

El uso de fungicidas de síntesis química para el control de *M. royeri* ha sido ensayado en diversos lugares; no obstante, los resultados no son del todo satisfactorios o son inconsistentes de año a año; otros puntos que se cuestionan son las altas frecuencias de aplicación, la contaminación que ocasionan este tipo de productos y también su costo, pues a menudo resulta antieconómico para el cacaotero, a pesar de tener efecto en la disminución de la enfermedad (Meza y León, 1972; Suárez, 1979; Merchán, 1980; Reyes y Marín, 1981; Achicanoy y Buritica, 1981; González, 1982; Cruz, 1986; Martí *et ál.*, 1987; Sánchez *et ál.*, 2003). Otra estrategia estudiada es el uso de la resistencia genética; sin embargo, aún no se dispone de material resistente a esta enfermedad (Sánchez, 1982; Brenes, 1983; Arguello, 2000; Palencia y Mejía, 2003; Pinzón y Rojas, 2004; Phillips, 2004; Phillips, 2006).

La humanidad tuvo conocimiento de las virtudes toxicológicas, farmacológicas y alucinógenas de las plantas con mucha anterioridad a su real descubrimiento por la fitoquímica. Los plaguicidas naturales han sido usados en la agricultura como una alternativa para el manejo de problemas fitosanitarios y muestran ventajas; por ejemplo, en su mayoría son biodegradables y no afectan la salud del hombre ni la del medio ambiente. (Vergara, 1997).

La importancia de las plantas se debe a que contienen principios activos en alguno

de sus órganos, los cuales, extraídos en forma adecuada y administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos que permiten el manejo de insectos-plaga y de microorganismos fitopatógenos; diversas investigaciones demuestran el potencial de los extractos de plantas en el manejo de problemas fitosanitarios ocasionados por hongos, (Hernández *et ál.*, 2007; Ramírez, 2008a, Barrera y Bautista, 2008). Una alternativa de elaboración de extractos está basada en el uso de técnicas simples y fácilmente reproducibles por los productores mediante métodos de infusión, extracción con alcohol y fermentación, entre otros (Ramírez, 2006).

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 la mancha negra (*Phytophthora* spp.) y la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Ramírez y López, 2006; Ramírez, 2008b), estas son el orégano (*Origanum vulgare* L), el jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) y el maguey morado (*Tradescantia spathacea* Swartz); además, el orégano y el jengibre han mostrado efecto sobre la inhibición de diversos tipos de bacterias y hongos que causan enfermedades en animales y en plantas de cultivo, tanto a nivel de campo como en la pos-cosecha (Bertelli *et ál.*, 2003; Nguefack, 2004; Kulisic *et ál.*, 2004; Nostro *et ál.*, 2004; Sahin *et ál.*, 2004; Sacchetti *et ál.*, 2005; Hersch *et ál.*, 2005; Barrera y Bautista, 2008; Ramírez, 2008b), también se reporta que el maguey morado tiene actividad anticancerígena, antivirales, antiinflamatorias, antimicrobianas (efecto controlador de infecciones gastrointestinales causados por *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*), bactericidas, fungicidas y últimamente anticancerígenas, antimutagénica y antigenotóxica (Domínguez, 2002; González *et ál.*, 2003; Ramírez, 2008b).

Con este estudio exploratorio se quiere establecer si formas sencillas de obtención de extractos de plantas con antecedentes de actividad antifúngica, pero de fácil y económica consecución, pueden ofrecer una opción que contribuya al manejo de la moniliasis del cacao y que sean fácilmente elaborados por los productores. Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó en condiciones de laboratorio el efecto de cuatro formas de extracción de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre el crecimiento y formación de conidias de *M. roreri*, y se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos con mayor potencial de control del hongo.

Materiales y métodos

Colecta del material vegetal

Las hojas de orégano (*Origanum vulgare* L.) y maguey (*Tradescantia spathacea* Swartz) fueron colectados en predios del Ejido Miguel Hidalgo del municipio de Tapachula, Chiapas, México, y los rizomas de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) en el municipio de Tuzantan, Chiapas, los cuales fueron trasladados en bolsas de plástico al laboratorio para la preparación de los extractos.

Obtención de extractos vegetales

Se emplearon 300 g de material fresco por litro de solvente y de cada planta se prepararon cuatro formas de extracción.

- *Presurizado*: proceso de extracción que consiste en cocer el material vegetal en una olla de presión para obtener un caldo vegetal. Dentro de una olla de presión se colocó el material vegetal fresco desmenuzado en un solvente que consiste de una solución de agua destilada y alcohol etílico (10:1). Se tapó herméticamente y se sometió a calor sin permitir la salida del vapor, se dejó enfriar sin quitar la tapa y, posteriormente, se

filtró.

- *Hidrolato por destilación*: para el proceso de extracción se utilizó el material vegetal fresco, bien picado y macerado, en un solvente que consiste de una solución de agua y alcohol etílico (10:1). Para obtener el extracto se emplea un destilador adaptado para este fin. El material vegetal se colocó dentro de la marmita del destilador junto con el solvente, se tapó 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 corriente se obtuvo el hidrolato.
- *Fermentado aeróbico*: El material vegetal finamente picado se colocó en un recipiente de vidrio adaptado como biofermentador y se le agregó agua destilada estéril. La mezcla se revulvió todos los días para que se oxigenara, fermentara y se filtrara.
- *Fermentado anaeróbico*: el material finamente picado se colocó junto con agua destilada estéril en un recipiente de vidrio cerrado herméticamente, adaptado para el proceso de biofermentación con una válvula de seguridad para salida de gases, se dejó fermentar y luego se obtuvo el compuesto por filtración.

Aislamiento del patógeno

El hongo *M. roreri* fue aislado de muestras de frutos enfermos en estado de mancha colectados en plantaciones de cacao de productores del municipio de Pichucalco, del estado de Chiapas, México, y trasladados al laboratorio donde se lavaron, desinfectaron y se dejaron esporular, colectando así sus conidias para ser cultivadas en condiciones de laboratorio, en cajas de petri de plástico estéril de 50 mm de diámetro, en medio de cultivo compuesto por agar DIFCO®

(2%), extracto de cacao (40%) y jugo V8 (20%) (ACJ), y se mantuvo en condiciones controladas de 25 °C +/- 2 °C.

Bioensayo por medio envenenado

Se realizó un ensayo exploratorio en el que cada extracto se añadió de manera individual a una concentración del 50% (volumen/volumen) al medio de cultivo previamente esterilizado, a una temperatura de 45°C, y se sometió a agitación vigorosa para garantizar la homogeneidad de la mezcla. Se procedió a servir en cajas petri de 50 mm, las cuales se dejaron en la cámara de flujo por un periodo de 24 horas; posterior a este tiempo, se procedió a la inoculación del hongo previamente aislado y de 12 días de siembra, y con ayuda de un sacabocados se obtuvieron porciones de la cepa de 0.5 cm en forma radial y se colocó una porción en el centro de cada caja petri.

Los cultivos fueron mantenidos en sala de cultivo bajo condiciones controladas de 25 °C +/- 2 °C y oscuridad. Con la finalidad de comparar el efecto de los extractos, se incluyeron dos testigos: uno absoluto, en el cual el hongo fue cultivado en el medio PDA DIFCO® sin ningún control, y un control o testigo químico, en el cual se incorporó el fungicida comercial con i.a. Bis- dimetil ditiocarbamato de Zn al 76% a dosis de 5g/l.

Inhibición micelial y de la formación de conidias

El efecto inhibitorio se cuantificó mediante el crecimiento del diámetro del micelio del patógeno, cada 24 horas; para ello se midió el crecimiento presentado por el hongo dentro de cada placa petri, durante 12 días. También se cuantificó la producción de esporas, realizando un raspado superficial del hongo y su lavado con agua, luego se empleó la dilución apropiada hasta lograr contarlas en la cámara de Neubauer para determinar el número de esporas por mililitro.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria

A los extractos que presentaron inhibición total del crecimiento y desarrollo del patógeno, se les determinó la concentración mínima inhibitoria; estos productos fueron evaluados a concentraciones del 40, 30, 20 y 10% (volumen/volumen). Se preparó el medio de cultivo con PDA al cual se añadió cada uno de los extractos a las concentraciones por estudiar; posteriormente se realizó la inoculación del patógeno. Como variable indicadora del efecto inhibitorio, cada 24 horas se midió el diámetro de crecimiento del micelio del patógeno durante 12 días, también se cuantificó la producción de esporas mediante el uso de la cámara de conteo de esporas Neubauer, tal como se describió anteriormente.

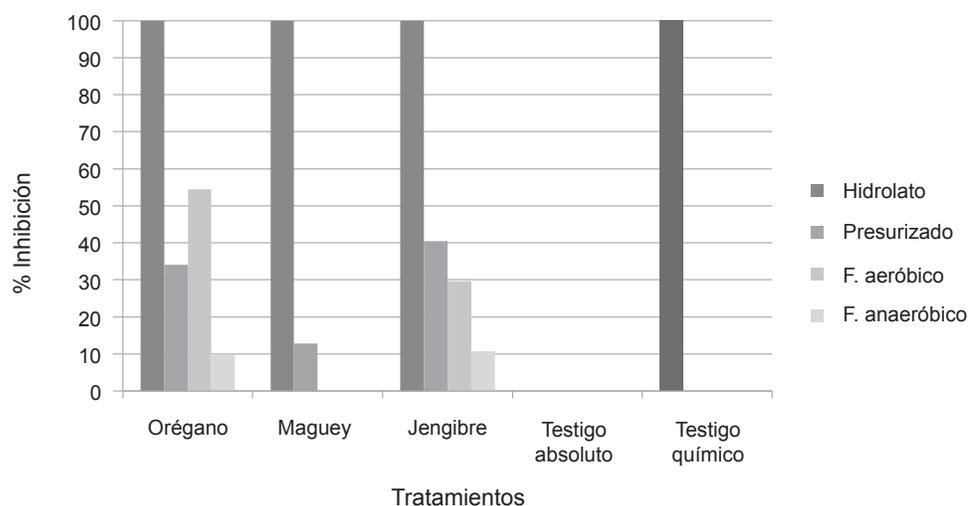
Diseño experimental

Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar, con cinco repeticiones cada uno; la unidad experimental consistió en una caja de petri. En todas las pruebas se incluyó un testigo absoluto y uno químico. Para determinar los efectos de los tratamientos estudiados, a los datos obtenidos se les practicó un análisis de varianza y la prueba de comparación de Tukey al 5%.

Resultados y discusión

Ensayo al 50% de concentración mediante el método de medio envenenado

En la figura 1 se aprecia el comportamiento de las tres plantas evaluadas en las cuatro formas de extracción sobre el crecimiento de *M. roreri*. Para el caso de *O. Vulgare*, se aprecia que el extracto en forma en hidrolato inhibió completamente el desarrollo del patógeno, seguido del fermentado aeróbico con un 54,4% de inhibición, mientras que para el presurizado fue de un 34% y el



	% de inhibición de crecimiento mm			
	Hidrolato	Presurizado	F. aeróbico	F. anaeróbico
Orégano	100	34	54,4	10
Maguey	100	12,8	0	0
Jengibre	100	40,4	29,6	10,8
Testigo absoluto	0			
Testigo químico	100			

Figura 1. Efecto de extractos de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* sobre el porcentaje de inhibición de *M. royeri*.

menor porcentaje de inhibición se observó en el fermentado anaeróbico, con un 10%.

Parece que la forma de extracción de *O. vulgare* ejerce influencia en la extracción de los metabolitos activos, ya que solo el hidrolato presentó inhibición total del crecimiento y formación de conidias del patógeno. Busquet *et al.*, (2005) y Sahin *et al.* (2004) mencionan que el componente más importante del orégano es el aceite esencial, que contiene del 60 al 75% de fenoles volátiles, particularmente timol y carvacrol, los cuales tienen una estructura química similar (carvacrol naturalmente es un isómero de timol) y un efecto antimicrobiano. Dicha composición química del aceite de orégano es muy variable, depende principalmente del material vegetal y su procedencia; de acuerdo con estos autores, la forma de

extracción por destilación por vapor es la más eficiente, lo cual es corroborado con el presente estudio, pues los resultados obtenidos indican que la forma de extracción por hidrolato (proceso de destilación) mostró el mejor efecto al inhibir totalmente el crecimiento y desarrollo de *M. royeri*.

Busquet *et al.*, (2005) mencionan que las estructuras fenólicas (carvacrol, eugenol o timol) se caracterizan por tener una actividad antimicrobiana más fuerte en comparación con otros metabolitos secundarios no fenólicos, esto posiblemente debido a la presencia de un grupo hydroxylo en la estructura fenólica (Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.* 2002). Con respecto a la forma en que estos metabolitos podrían actuar, Ultee *et al.*, (2002) citados por Busquet *et al.*, (2005) sugieren que el carvacrol actúa

como un transportador transmembranal de cationes monovalentes por intercambio de los protones hydroxilo (procedentes del grupo fenólico) por otros tales como el ión potasio, similar al modo de acción de ionóforos. Tales eventos podrían resultar en la falta de fuerza móvil de un protón, consecuentemente un decremento en la síntesis de ATP y, finalmente, la muerte celular.

Con respecto a *T. Spathacea*, la forma de extracción mediante destilación logró inhibir completamente el crecimiento del patógeno, el presurizado redujo en un 43,6%, mientras que los dos tipos de fermentación mostraron un crecimiento similar al testigo absoluto. Las cuatro formas de extracción de *Z. officinale* mostraron efectos controladores del crecimiento de *M. roreri*, ya que presentaron porcentajes de inhibición del 100%, 40,4%, 29,6% y 10,8% para el hidrolato, presurizado,

fermentación aeróbica y fermentación anaeróbica, respectivamente.

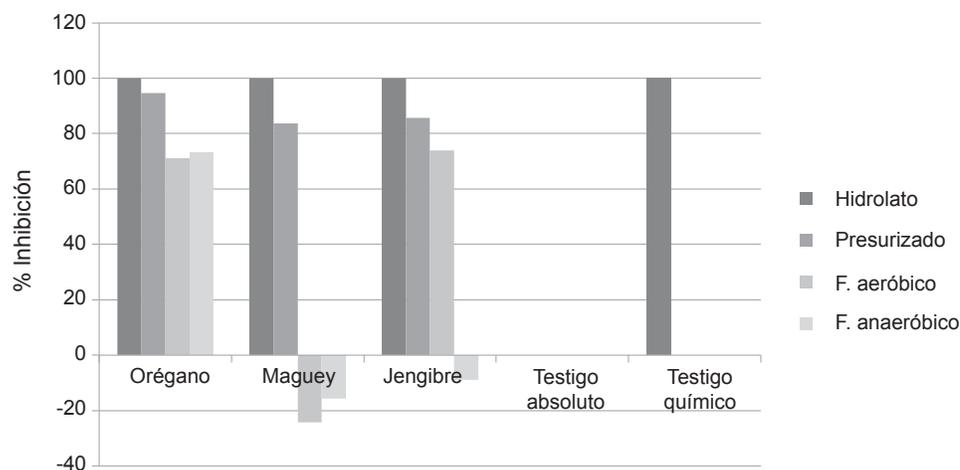
Estos resultados son corroborados por el análisis estadístico practicado, ya que según este, existen diferencias altamente significativas entre tratamientos. La prueba de comparación de medias de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$) separó los tratamientos que inhibieron completamente el crecimiento (hidrolatos de orégano, maguey y jengibre) de otro grupo de extractos que permitieron cierta inhibición del hongo y un tercer grupo que permitió el crecimiento total del patógeno, como fueron el maguey en fermentaciones aeróbicas y anaeróbicas, así como el testigo absoluto (cuadro 1).

Con respecto a la producción de conidias (Figura 2), todos los extractos obtenidos de las hojas de *O. vulgare* inhibieron la formación de conidias entre el 100 y el 71% a pesar de que, como se vio anteriormente,

Cuadro 1. Crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri* por efecto de extractos a concentración del 50% (v/v) de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale*

Tratamientos	Crecimiento mm	Tukey*	Conidias/mLX 10 ⁷	Tukey*
Orégano hidrolato	0	A	0	A
Maguey hidrolato	0	A	0	A
Jengibre hidrolato	0	A	0	A
Testigo químico	0	A	0	A
Orégano aeróbica	22,80	BC	9,98	CD
Jengibre presurizado	29,80	CDF	4,91	ABC
Orégano presurizado	33,00	DEF	1,81	A
Jengibre aeróbica	35,20	EF	8,98	BCD
Maguey presurizado	43,60	GH	5,59	ABC
Jengibre anaeróbica	44,60	GH	37,56	EF
Orégano anaeróbica	45,00	GH	9,18	BCD
Maguey aeróbica	50,00	H	42,81	F
Maguey anaeróbica	50,00	H	39,86	EF
Testigo absoluto	50,00	H	34,46	E
Coefficiente de variación	1,52		1,83	

*Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.



Tratamientos	% de inhibición de formación de conidias*mL ⁻¹			
	Hidrolato	Presurizado	F. aeróbico	F. anaeróbico
Orégano	100	94,72	71,03	73,35
Maguey	100	83,76	-24,24	-15,67
Jengibre	100	85,75	73,93	-9
Testigo absoluto	0			
Testigo químico	100			

Figura 2. Efecto de extractos de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* sobre la inhibición en la formación de conidias de *M. royeri*.

se presentó formación de micelio, es decir, que estos extractos muestran actividad antiesporulante. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el hidrolato de orégano tiene efecto regulador de *M. royeri*, sumándose a los reportes de gran actividad antibacteriana y antioxidante, así como de preservativo natural de alimentos (Kulisic *et al.*, 2004; Nostro *et al.*, 2004; Hersch *et al.*, 2005).

Para el caso del *T. spathacea*, tan solo las formas de hidrolato y presurizado mostraron inhibición en la formación de conidias, con un 100 y un 83,7%, respectivamente; por el contrario, los extractos obtenidos por los dos tipos de fermentación permitieron una formación de conidias que superó la producción del testigo absoluto con un 15,6% más para la fermentación de tipo anaeróbica y un 24,2% para la de tipo aeróbica.

Dado el efecto antiesporulante del hidrolato y el presurizado que muestra *T. spathacea*, estos resultados corroboran y se suman a resultados de investigaciones realizadas en diversas partes del mundo, en las cuales se han reportado 33 diferentes actividades biológicas de esta planta, dentro de las que destacan actividades antivirales, antiinflamatorias, antimicrobianas (efecto controlador de infecciones gastrointestinales causados por *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*), bactericidas, fungicidas y últimamente anticancerígenas.

Los estudios químicos de *T. spathacea* desarrollados por González *et al.* (2003) y Domínguez (2002) demostraron que esta planta posee compuestos con estructura de tipo flavónico o flavonoides, cuyas propiedades tienen efecto de inhibición en la formación de tumores, así como

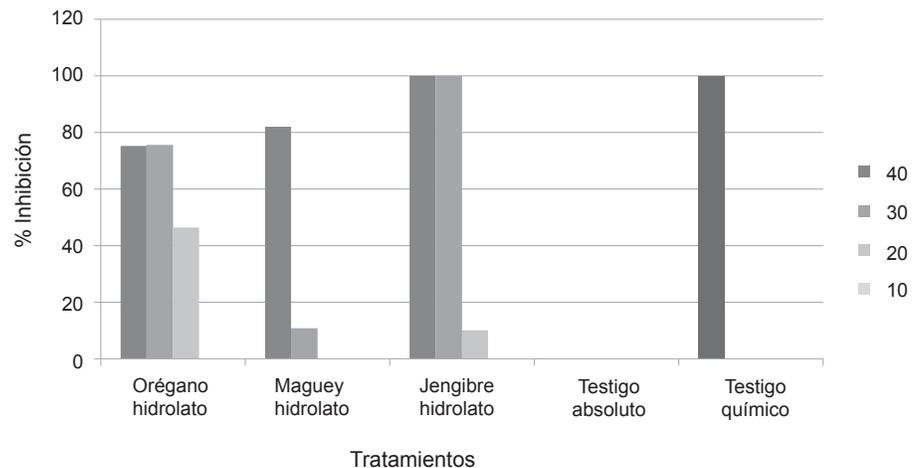
que los extractos polares del grupo de las cumarinas tienen efecto bactericida sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*. El *Z. Officinale* registró inhibición en la formación de conidias para el hidrolato en un 100%, el presurizado con el 85,7% y la fermentación aeróbica redujo en un 73,93% la formación de estas estructuras con respecto al testigo absoluto, siendo la fermentación anaeróbica la única que estimuló su formación.

El análisis de varianza indicó diferencias altamente significativas entre los tratamientos, la prueba de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$) mostró cómo los hidrolatos de orégano, maguey y jengibre y el testigo químico registraron diferencias con el testigo absoluto (el cual mostró el mayor valor con 34×10^7 conidias/mL) y con los demás tratamientos, además del grupo de extractos que estimularon la producción

de conidias (jengibre anaeróbica, maguey anaeróbica, maguey aeróbica) (cuadro 1). Dado que los hidrolatos de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* presentaron el mejor efecto regulador sobre *M. roreri*, pasaron a la siguiente prueba con el fin de determinarles la concentración mínima inhibitoria.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

En la figura 3 se muestran los resultados del comportamiento de los hidrolatos de orégano, maguey y jengibre frente al crecimiento de *M. roreri*, en el cual se aprecia, para el caso del jengibre, a concentraciones del 40 y 30% la inhibición completa del desarrollo del hongo, siendo la concentración más baja la considerada como su CMI, mientras que para el orégano y el maguey se presentó



Concentraciones	% de inhibición de crecimiento mm			
	40	30	20	10
Orégano hidrolato	75,2	75,6	46,4	0
Maguey hidrolato	82	10,8	0	0
Jengibre hidrolato	100	100	10	0
Testigo absoluto	0			
Testigo químico	100			

Figura 3. Efecto de cuatro concentraciones de extractos de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de *M. roreri*.

Cuadro 2. Crecimiento micelial y formación de conidias de *M. rozeri* por efecto de cuatro concentraciones de extractos de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale*.

Tratamientos	Crecimiento mm	Tukey*	Conidias/mLX 10 ⁷	Tukey*
Jengibre hidrolato 40%	0	A	0	A
Jengibre hidrolato 30%	0	A	0	A
Testigo químico	0	A	0	A
Maguey hidrolato 40%	9,00	AB	2,86	AB
Orégano hidrolato 30%	12,20	AB	2,34	AB
Orégano hidrolato 40%	12,40	AB	2,81	AB
Orégano hidrolato 20%	26,80	E	3,56	AB
Maguey hidrolato 30%	44,60	FG	8,20	BCD
Jengibre hidrolato 20%	45,00	FG	8,63	BCD
Orégano hidrolato 10%	50,00	G	25,87	EFG
Maguey hidrolato 20%	50,00	G	23,31	EF
Maguey hidrolato 10%	50,00	G	30,20	FGH
Jengibre hidrolato 10%	50,00	G	27,61	FGH
Testigo absoluto	50,00	G	40,32	I
Coefficiente de variación	0,88		0,1	

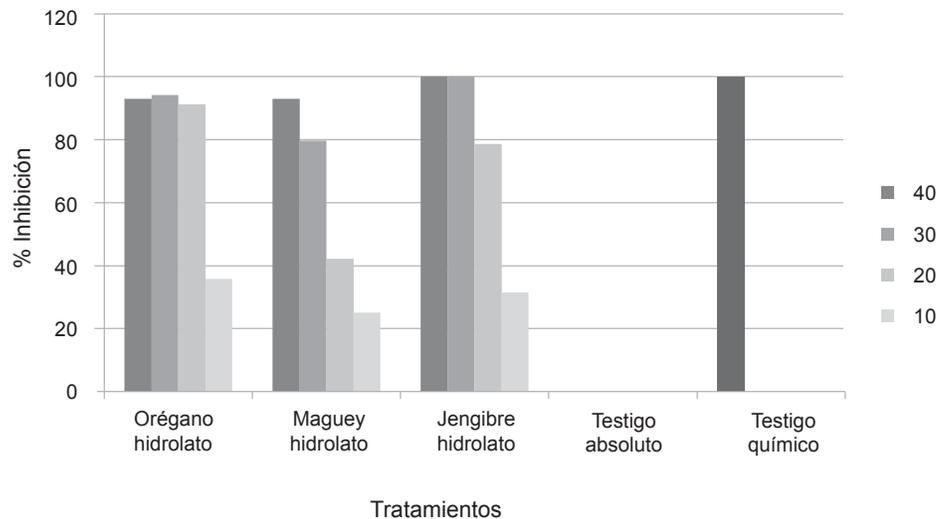
*Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

crecimiento en las cuatro concentraciones evaluadas, por lo que su CMI es del 50%. El análisis estadístico practicado corroboró lo anteriormente mencionado, al existir diferencias altamente significativas entre tratamientos. La prueba de comparación de medias de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$) señala que los tratamientos que inhibieron completamente el crecimiento del patógeno muestran diferencias estadísticas con los demás tratamientos; sin embargo, es de resaltar que todas las concentraciones al 10% y los hidrolatos de maguey y jengibre al 20% no registraron diferencias con el testigo absoluto, pero sí con los demás tratamientos (cuadro 2).

Con respecto a la producción de conidias, todas las concentraciones de los hidrolatos de orégano, maguey y jengibre inhibieron la producción de conidias, tal como se aprecia en la figura 4. Es de destacar que para el caso del jengibre

en las concentraciones de 40 y 30%, al no permitir el crecimiento, tampoco permitió la formación de conidias. En las concentraciones de 20 y 10%, a pesar de que creció igual que el testigo absoluto, inhibió en un 78,5 y un 31,52% respectivamente la producción de conidias.

Estos resultados encontrados para el jengibre coinciden con los reportados por Nguetack *et al.*, (2004), quienes determinaron el efecto inhibitorio de *Zingiber officinale* sobre aislamientos de tres hongos procedentes de alimentos (*Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*), extractos que fueron obtenidos por destilación y que mostraron inhibición en el crecimiento y formación de conidias de los tres hongos, pero a concentraciones superiores que las de otras plantas como el *Thymus vulgaris*. Sacchetti *et al.*, (2005) estudiaron el efecto antimicrobiano de 11



	% de inhibición de formación de conidias* mL ⁻¹			
Concentraciones	40	30	20	10
Orégano hidrolato	93,03	94,19	91,17	35,83
Maguey hidrolato	92,9	79,66	42,18	25
Jengibre hidrolato	100	100	78,59	31,52
Testigo absoluto	0			
Testigo químico	100			

Figura 4. Efecto de cuatro concentraciones de extractos de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* sobre el porcentaje de inhibición de la producción de conidias de *M. roseri*.

plantas sobre levaduras presentes en los alimentos (*Candida albicans*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*), los resultados reportados para el jengibre indicaron efecto inhibitorio de su aceite pero a concentraciones altas; además, muestran que la presencia de fenilpropanoides en el jengibre podría ser el compuesto que le dé propiedades de control sobre dichas levaduras.

Para el orégano se observa cómo a pesar de que permitió el crecimiento de *M. roseri* en las cuatro concentraciones inhibió la formación de conidias entre un 94,19 y un 35,5% con respecto al testigo absoluto, situación similar sucedió con el maguey donde los porcentajes de

inhibición estuvieron entre un 92,85 y un 25,9%. El análisis estadístico practicado corroboró lo anteriormente mencionado, ya que según este, existen diferencias altamente significativas entre tratamientos. La Prueba de comparación de medias de rango múltiple de Tukey ($P < 0.05$) señaló que las concentraciones de todos los tratamientos mostraron diferencias con el testigo absoluto.

Estos datos concuerdan con lo reportado por Mendez *et al.* (2006); Ramírez y Ávila (2002); Miño y Uricoechea (2001) y Gutiérrez *et al.*, (2003), quienes expresaron que la forma de extracción en una misma planta origina extractos con efectos diferentes sobre los patógenos estudiados, y que la destilación es una de

las más eficientes; sin embargo, para el caso de este estudio, a pesar de que las tres plantas mostraron diferentes porcentajes de inhibición para los hidrolatos y presurizados, en el caso de los fermentados de maguey y jengibre también existió estimulación en la formación de conidias, situación que debe ser tomada en cuenta. La concentración mínima inhibitoria para *Z. officinale* fue la más baja de los tres hidrolatos probados, con el 30%, la cual es alta al compararla con otros trabajos similares, aunque de diferente planta y patógeno.

Conclusiones

Los extractos elaborados a partir de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* poseen metabolitos capaces de inhibir el crecimiento y la formación de conidias del hongo *M. royeri*. La forma de extracción más eficiente fue el hidrolato por destilación, ya que de las tres plantas evaluadas mostró los mayores efectos de inhibición, tanto en el crecimiento como en la producción de conidias del hongo causante de la moniliasis del cacao; sin embargo, el presurizado de las tres plantas evaluado al 50% (V/V) registró inhibición en la formación de conidias superior al 80%.

El hidrolato de *Z. officinale* mostró la mayor eficiencia en el control del crecimiento y desarrollo del patógeno, pues su hidrolato registró la concentración mínima inhibitoria más baja, con un 30% (V/V), y la concentración del 20% inhibió la formación de conidias en un 78%. Si bien los hidrolatos de maguey y orégano registraron su concentración mínima inhibitoria al 50%, a concentraciones inferiores lograron reducir la formación de conidias entre un 94 y un 25%.

Los presurizados de jengibre y orégano y la fermentación aeróbica de orégano a concentración del 50% pueden ser alternativas económicas y fácilmente elaboradas por productores para ser

integradas al manejo de la moniliasis del cacao. Tal estudio muestra evidencias preliminares de que los extractos vegetales como los obtenidos a partir de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* pueden resultar en una estrategia sustentable para el manejo de la moniliasis causada por *M. royeri* en cacao.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Fundación Produce Chiapas A.C. por el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía

- Achicanoy, H. & Buritica, P. (1981). *Evaluación in vitro de fungicidas para el control de Crinipellis pernicioso (Stahel) Singer y Moniliophthora royeri (Cif & Par) Evans et ál.*, In: 8ª. Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Cartagena, Colombia. Proceedings: 419-423.
- Argüello, C. O. (2000). *Manejo integrado de monilia en cacao (Theobroma cacao L.) en Santander*. In: Mejía, F. L. A., y Argüello C. O. (comp.). *Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao*. Corpoica, Bucaramanga, Colombia. pp: 74-84.
- Barrera, N. L. & Bautista, B. S. (2008). *Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de Cestrum nocturnum L. sobre el crecimiento micelial de Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill.* Revista Mexicana de Fitopatología 26:27-31.
- Bertelli D; M. Plessi & F. Miglietta. 2003. *Effect of microwaves on volatile compounds in origanum*. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 36: 555-560.
- Brenes, O. (1983). *Evaluación de la resistencia a Monilia royeri y su relación con algunas características morfológicas del fruto de cultivares de cacao Theobroma cacao L.* Tesis Mag. Sci., Universidad de Costa Rica-Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. 60 p.
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A. & Kamel, C. (2005). *Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants*

- on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*. Article in press. Received 17 March 2004; received in revised form 22 February 2005; accepted 12 March 2005.
- 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 para Ingeniero agrónomo. Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Costa Rica 14- 47p.
- Domínguez, O. M. A. (2002). *Elucidación estructural y actividad antimicrobiana de los metabolitos presentes en *Rhoeo discolor* L. Hér Hance*. Tesis Doctoral en Ciencias Area Biotecnología. Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
- Evans, H. C. (1986). *A reassessment of *Moniliophthora (Monilia) pod rot of cocoa**. *Cocoa Growers' Bull.* 37:34-43.
- Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia. (2004). *Modernización de la cacaocultura en el departamento de Cundinamarca: una aproximación a la producción ecológica de cacao*. Fedecacao, Departamento de Cundinamarca, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. 24 p.
- González Ávila, M.; Arriaga Alba, M.; de la Garza, M., del Carmen Hernández Pretelín, M, Domínguez Ortiz, M.A., Fattel Fazenda, S., Villa Treviño, S. (2003). *Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract*. In: *Toxicol In Vitro*. Feb;17(1):77-83.
- González, L.C. (1982). *Epifitología y combate de la moniliasis del cacao*. Universidad de Costa Rica. Facultad de Agronomía, San Pedro De Montes de Oca, Costa Rica. Informe anual de proyecto de investigación. 21 p.
- Gutiérrez, J. A., Agudelo, C. A., Ramírez, S.I., Velosa, M. A. 2003. *Control del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers ex. Fr.) en el cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth) mediante la aplicación de extractos de ajo (*Allium sativum* L.) Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) y Repollo (*Brassica oleraceae*). In: *Ciencia en Desarrollo*, Vol 1, No. 1 Octubre de 2003, 93-104.*
- Helander, I. M.; Alakomi, H.; Latva-kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I; Smid, E.J.; Gorris, L.G.M. & Von Wright, A. (1998). *Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria*. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3590-3595.
- Hernández, L. A.N.; Bautista, B. S. & Velázquez, V. M.G. (2007). *Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades en Poscosecha*. *Revista Fitotecnia Mexicana* Vol 30 (2): 119-123.
- Hersch-Martínez P., B.E; Leaños-Miranda, F. Solórzano-Santos. (2005). *Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico*. *Fitoterapia* 76: 453-457.
- Kulicic T.; A. Radonic; V. Katalinic & M. Milos. (2004). *Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil*. *Food chemistry* 85: 633-640.
- López, B.O.; González, M.O.; Ramírez, G.S.I.; Lee, R.V.; Ramírez, G.M.B.; Alvarado G.A. & Gehrke, V.M. (2006). *Diagnóstico y técnicas para el manejo de la moniliasis del cacao*. Universidad Autónoma de Chiapas; Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Impreso: Digitall. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 40 p.
- Martí, J.; Galindo, J.; Ramírez, C. & Enríquez, G. (1987). *Evaluación del combate biológico y químico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica*. In: 10^a. Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Santo Domingo, República Dominicana. Proceedings: 453-497.
- Méndez R. J.; Ramírez G. S. I. & López B. O. (2006). *Efecto biorregulador in vitro de extractos de pimienta (*Pimenta dioica*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y maguey (*Rhoeo discolor*) sobre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz causante de la antracnosis del cacao (*Theobroma cacao*)*. In: Pérez Q. N., Pinson R. E. P., Caballero R. F. H., Solís E. M., Esquinca A. H. A. (ed). *Sistema Institucional de Investigación SIINV-UNACH Producción 2003-2006*. Vol. 1. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. pp: 28-34. ISBN: 970-9825-06-2
- 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. pp: 63.
- Meza, S. C. R., & León, V. (1972). *Control*

- químico de la moniliasis y mancha de agua del cacao. Revista de la Facultad de Agronomía (Venezuela) 2 (1): 17
- Miño, J. & Uricoechea, J. (2001). *Evaluación de seis métodos farmacológicos de preparación de extractos de repollo (Brassica oleraceae), Ajo (Allium sativum) y Eucalipto (Eucalyptus globulus) en el control de Botrytis cinerea Pers. Ex. Fr. en el cultivo de la mora (Rubus glaucus) en condiciones de laboratorio en Tunja, Boyacá*. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 91 p.
- Nguefack, J.; Leth, V.; Amvam Zollo, P.H. Mathur, S.B. (2004). *Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi*. in: International Journal of Food Microbiology 94: 329–334.
- Nostro, A.; Blanco, A.R.; Cannatelli, M.A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I.; Roccaro, A.S. Alonzo, V. (2004). *Susceptibility of methicillin-resistant taphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol*. FEMS Microbiology Letters 230: 191-195.
- Palencia, C.G. & Mejía, F.L. (2003). *Producción masiva de materiales clonales de cacao Theobroma cacao L*. Manual técnico. Corpoica. Bucaramanga, Colombia. 58 p.
- Phillips, W. (2004). *La moniliasis del cacao: Una seria amenaza para el cacao en México*. In: Memorias Simposio Nacional de manejo fitosanitario de cultivos tropicales. Villa Hermosa. Tabasco. pp: 91-99.
- Phillips-Mora, W.; Coutiño, A.; Ortiz, C. F.; López, A. P.; Hernández, J. & Aime, M. C. (2006). *First report of Moniliophthora roreri causing frosty pod rot (= moniliasis disease) of cacao in Mexico*. Plant Pathol. 55:584.
- Phillips-Mora, W. & Wilkinson, M. J. (2007). *Biodiversity and biogeography of the cacao (Theobroma cacao L.) pathogen Moniliophthora roreri (Cif.) Evans et al*. Plant Pathology (2007) 56, 911–922.
- Pinzón, U.J.O. & Rojas, A.J. (2004). *Guía técnica para el cultivo del cacao*. Fedecacao, Bogotá, Colombia. 187p.
- Ramírez, O. & Ávila, C. (2002). *Evaluación de hidrolatos en el control de Sclerotium cepivorum, Ditylenchus dipsaci y complejo amarillera (Alternaria porri, Peronospora destructor y Stemphyllium sp.) en cebolla de bulbo (Allium cepa)*. In: XXIII Congreso ASCOLFI. Asociación Colombiana de fitopatología y Ciencias Afines. Bogotá, Colombia. Memorias: 41.
- Ramírez, G. S. I & López B. O. (2006). *El manejo orgánico integral de insectos plagas y enfermedades en el cultivo del cacao (Theobroma cacao L.)*. In: López B. O., Ramírez G. S. I., Ramírez G. M., Moreno B. G., Alvarado G. A. (ed). (2006). Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Primera edición, Editorial UPTC-UNACH, Tunja, Boyacá, Colombia. pp: 240-264.
- Ramírez, G. M. (2006). *Técnicas para la determinación de moléculas bioactivas de extractos de plantas para la formulación de bioplaguicidas*. In: López, O. et ál., (2006). Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Imprenta de la UPTC, Colombia, 247 p.
- Ramírez, G. S. I. (2008a). *La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México*. Tecnología en Marcha. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Vol. 21 -1-2008. Pág. 97 -110. ISSN 0379-3982.
- Ramírez, G. S. I. (2008b). *Extractos vegetales para el manejo orgánico de la mancha negra (Phytophthora palmivora) del cacao (Theobroma cacao)*. Tesis Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas- México. 92 p.
- Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M. & Bruni, R. (2005). *Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods*. Food Chemistry 91: 621–632.
- Sahin, F., M.; Güllüce, D. Daferera; A. Sökmen, M. Sökmen, M. Polissiou, G. Agar, H. Özer. (2004). *Biological activities of the essential oils and methanol extract of Origanum vulgare ssp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey*. Food Control 15: 549-557.
- Sánchez, L.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. & Rincón, J. (2003). *Control químico y cultural de la moniliasis (Moniliophthora roreri cif & par) del cacao (Theobroma cacao L) en el Estado Barinas*. Rev. Fac. Agron. 20: 188-194.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2010. *Estadísticas del cultivo de cacao*. Elaborado por el SIAP con información de las Delegaciones de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (SAGARPA). [online]. [citado 12 abril 2010]. Disponible en <http://www.siap.gob.mx>

Suárez, C. (1979). *Las enfermedades del cacao en Latinoamérica*. In: 7° Conferencia

Internacional de Investigación en Cacao. Douala, Cameroun. Proceedings: 251-254.

Ultee, A.; Bennik, M. H. & Moezelaar, R., (2002). *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 68, 1561–1568.

Vergara, R. (1997). *De la agricultura tradicional a la agricultura biológica*. Memorias Seminario Regional. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.