

Extractos por destilación de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* para el manejo de *Moniliophthora roreri* de *Theobroma cacao**

Extracts by distillation of *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* and *Zingiber officinale* for handling of *Moniliophthora roreri* of *Theobroma cacao*

Luz Elena Tamayo España¹, Sandra Isabel Ramírez González^{1§}, Orlando López Báez¹, Ricardo René Quiroga Madrigal² y Saúl Espinosa Zaragoza³

¹Universidad Autónoma de Chiapas. AUDES Cacao-Chocolate. Campus Ciudad Universitaria, carretera Terán- Ejido, km 8 Emiliano Zapata. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Tel: (961) 6178000 Ext. 1725 y 1722. (luzelena_0182@hotmail.com; olopez@unach.mx). ²Universidad Autónoma de Chiapas, México. Facultad de Ciencias Agronómicas. Cuerpo Académico Recursos Fitogenéticos Tropicales. Carretera Ocozocuaula-Villaflores, km. 84.5, Villaflores, Chiapas. (quiroga@unach.mx). ³Universidad Autónoma de Chiapas, México. Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV. Entronque Carretera Costera y Estación Huehuetán, C. P. 30660. Tel. (964) 62 7 01 28. (saulez1@gmail.com). [§]Autora para correspondencia: sanirg@yahoo.com.

Resumen

El cacao es un cultivo de importancia económica, social y ambiental para el sureste mexicano y de gran renombre mundial dada la calidad de materia prima para la elaboración de chocolates. Sin embargo, existen varios factores que afectan la calidad de los granos de cacao, siendo las enfermedades la principal limitante. La moniliasis (*Moniliophthora roreri*) es la más peligrosa y destructiva del cultivo, y existen pocas alternativas para el manejo orgánico de esta enfermedad. Por ello, en el presente trabajo se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos obtenidos por destilación de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* sobre *M. roreri*. Para lo cual se aisló el hongo en laboratorio; se elaboraron los extractos en planta fresca (300 g L⁻¹ y 600 g L⁻¹) y seca (45 g L⁻¹ y 90 g L⁻¹), cada uno obtenido en dos relaciones agua-alcohol (10:0 y 10:1). Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) evaluando crecimiento micelial, conidias totales y germinadas. Se realizó análisis de varianza y comparaciones de medias Tukey ($p \leq 0.05\%$). Los resultados muestran que las tres plantas poseen metabolitos capaces de inhibir el crecimiento y formación de conidias a

Abstract

The cocoa is a crop of economic, social and environmental importance for the Mexican southeast and world-renowned high given the quality of raw material for the production of chocolates. However, there are several factors that affect the quality of cocoa beans, being the main limiting disease. moniliasis (*Moniliophthora roreri*) is the most dangerous and destructive crop, and there are few alternatives for organic management of this disease. Therefore, in this study was evaluated the inhibitory effect of the extracts obtained by distillation of *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* on *M. roreri*. To which the fungus was isolated in the laboratory; extracts were prepared in fresh plant (300 g L⁻¹ and 600 g L⁻¹) and dried (45 g L⁻¹ and 90 g L⁻¹), each obtained in two water-alcohol ratios (10:0 and 10:1). The minimum inhibitory concentration (CMI) was determined by evaluating mycelial growth, total and germinated conidium. The analysis of variance and mean comparisons Tukey ($p \leq 0.05\%$) was performed. The results show that the three plants have metabolites capable of inhibiting the growth and formation of conidium at

concentraciones de 50 y 40% tanto en planta fresca como seca, utilizando para la mejor extracción de sus metabolitos alcohol, y su CMI fue de 40%. Para la inhibición total del crecimiento y desarrollo de *M. royeri* para las tres plantas fueron más eficaces los extractos obtenidos a partir de 300 g de material fresco L⁻¹ y como solvente agua-alcohol relación 10:1.

Palabras clave: agricultura orgánica, cacao, control de patógenos, enfermedad, inhibitorio.

Introducción

El cacao es originario de las zonas tropicales de América (cuencas del Amazonas y del Orinoco). Su manejo fue extensivo en Mesoamérica, y luego cultivado intensivamente por los mayas en México (Mendoza, 2013). Actualmente, se cultiva en más de 60 países, la producción mundial se concentra en África, Asia, Centro, Norte y Sudamérica. Hoy en día, más de 20 millones de personas de todo el mundo dependen directamente del cultivo para subsistir. 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 t, en cuanto a su rendimiento promedio reportado para el año 2014 fue de 0.46 t ha⁻¹. (SIAP, 2014)

La *M. royeri* es el principal problema fitosanitario que enfrenta la producción cacaotera en México y la mayoría de los países de Centro y Suramérica, esta enfermedad genera grandes pérdidas en el cultivo de cacao, llegando a ser hasta 100% si las condiciones climáticas son favorables y los árboles son altamente susceptibles a la enfermedad (López *et al.*, 2006; Ramírez, 2008). 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 manejo cultural; sin embargo, la poca capacitación a los productores y sus bajos recursos económicos para implementarlos hacen difícil su control (López *et al.*, 2006). Por ello, es necesario generar alternativas que permitan reducir las pérdidas ocasionadas por este patógeno y que permitan mejorar los rendimientos (Meza y León, 1972; Merchán, 1980; Reyes y Marín, 1981; Barros, 1982; González, 1982; Sánchez, 1982; Cruz, 1986; Gamboa y Rincón, 2003; Palencia y Mejía, 2003; Phillips, 2004; Phillips, 2006).

concentrations of 50 and 40% in both fresh plant as dry, using the best extraction of alcohol, metabolites, and CMI was 40%. For complete inhibition of growth and development of *M. royeri* for the three plants were more effective extracts obtained from 300 g of fresh material L⁻¹ and as a solvent water-alcohol 10:1 ratio.

Keywords: cocoa, disease, inhibitory, organic agriculture, pathogen control.

Introduction

The cocoa is native to tropical areas of America (Amazon and Orinoco). Handling was extensive in Mesoamerica, and then intensively cultivated by the Maya in Mexico (Mendoza, 2013). Currently, it is grown in more than 60 countries, global production is concentrated in Africa, Asia, Central, North and South America. Today, more than 20 million people worldwide depend directly on the crop for their livelihoods. Mexico has a close contribute 1% to the world production of cocoa, from 61 168.10 ha, located in four states, with Tabasco and Chiapas the largest producers, generating more than eight million days a year, with a contribution of 27 844.12 t in terms of average performance reported for 2014 it was 0.46 t ha⁻¹ (SIAP, 2014)

The *M. royeri* plant is the main problem facing cocoa production in Mexico and most countries in Central and South America, this disease causes great losses in the cultivation of cocoa, becoming up to 100% if weather conditions are favorable and trees are highly susceptible to the disease (López *et al.*, 2006; Ramírez, 2008). The management of this disease is based on the integration of agronomic practices such as modernization, reduction of primary inoculum, planting of highly productive clones and continuing implementation of sanitation practices and cultural management; however, little training to farmers and low income make it difficult to implement control (López *et al.*, 2006). It is therefore necessary to generate alternatives to reduce the losses caused by this pathogen and to improve yields (Meza and León, 1972; Merchán, 1980; Reyes and Marín, 1981; Barros, 1982; González, 1982; Sánchez, 1982; Cruz, 1986; Gamboa and Rincón, 2003; Palencia and Mejía, 2003; Phillips, 2004; Phillips, 2006).

Existe un incremento sostenido en la demanda de cacao orgánico; sin embargo, la oferta es insuficiente (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, 2010), por lo cual, se plantea la necesidad de desarrollar alternativas para el control de la moniliasis, aceptadas dentro de la normatividad de producción orgánica. El uso de extractos de origen vegetal permite que los cultivos obtengan con mayor facilidad el certificado orgánico. Otra ventaja es que sus costos de producción son bajos y con un adecuado plan de manejo se aumentan las probabilidades de controlar las plagas y obtener un producto de buena calidad para el mercado.

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 (Vergara, 1997). Diversas investigaciones demuestran el potencial de los extractos de plantas en el manejo de problemas fitosanitarios ocasionados por hongos (Hernández *et al.*, 2007; Ramírez, 2008; Barrera y Bautista, 2008; según lo reporta Ramírez *et al.*, 2011); la misma autora, reportó el efecto inhibitorio en el crecimiento y desarrollo de *M. roreri* con extractos obtenidos de *Origanum vulgare* L (orégano), *Tradescantia spathacea* Swartz (maguey morado) y *Zingiber officinale* Roscoe (jengibre). Por lo tanto, el presente trabajo plantea optimizar el proceso de obtención de los extractos, evaluando la relación soluto-solvente en el proceso de extracción mediante destilación tanto con material fresco como seco de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* sobre la inhibición del crecimiento y formación de conidias de *M. roreri* en condiciones de laboratorio y como alternativa para el manejo de la moniliasis del cacao en sistemas de producción orgánica.

Materiales y métodos

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Agrotecnologías de la AUDES Cacao-Chocolate de la UNACH, ubicado en Ciudad Universitaria, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas- México.

Determinación relación óptima de soluto y solvente

Multiplicación del hongo: a partir de la cepa de *M. roreri* que fue previamente aislada en el Laboratorio de Agrotecnologías de la AUDES, se realizó la multiplicación

There is a steady increase in demand for organic cocoa increase; however, the supply is insufficient (Tropical Agricultural Research and Higher Education, 2010), therefore, the need to develop alternatives for the control of moniliasis, accepted within the regulations of organic production arises. The use of extracts of plant origin allows obtain the certified organic crops more easily. Another advantage is that production costs are low and with proper management plan are increased the chances of controlling pests and get a good quality product for the market.

The mankind became aware of toxicological, pharmacological and hallucinogenic plants well in advance of their actual discovery by the phytochemical. The natural pesticides have been used in agriculture as an alternative for the management of phytosanitary problems (Vergara, 1997). Various studies show the potential of plant extracts in the management of phytosanitary problems caused by fungi (Hernández *et al.*, 2007; Ramírez, 2008; Barrera and Bautista, 2008; as reported by Ramírez *et al.*, 2011); the same author, reported the inhibitory effect on the growth and development of *M. roreri* with extracts from *Origanum vulgare* L. (oregano), *Tradescantia spathacea* Swartz (purple maguey) and *Zingiber officinale* Roscoe (ginger). Therefore, this paper presents optimize the process of obtaining extracts, evaluating the solute-solvent ratio in the extraction process by distillation both with fresh material as dry of *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* and *Zingiber officinale* on growth inhibition and formation of conidium of *M. roreri* under laboratory conditions and as an alternative for the management of moniliasis of cacao in organic production systems.

Materials and methods

The research was conducted at the Laboratory of agrotechnologies of the AUDES Cacao-Chocolate of the UNACH located in University City, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico.

Determining optimal ratio of solute and solvent.

Multiplication of the fungus: from strain of *M. roreri* that was previously isolated in the Laboratory of AUDES agrotechnologies, multiplication of the pathogen was performed by peeling or passes in potato dextrose culture media agar (PDA), which they incubated at a temperature of 23 °C ±2 °C, for 15 days.

del patógeno mediante repiques o pases en medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA), los cuales se incubaron a una temperatura de 23 °C \pm 2 °C, durante 15 días.

Obtención de los hidrolatos: obtenidos a partir de orégano, maguey morado y jengibre (Cuadro 1), tanto en planta fresca (300 g L⁻¹ y 600 g L⁻¹) como seca (45 g L⁻¹ y 90 g L⁻¹) en dos relaciones (10:1 y 10:0). Este proceso se realizó lavando, picando y pesando la cantidad necesaria; posteriormente se colocó en la marmita del destilador con la mezcla de solvente correspondiente a las diferentes relaciones y se selló herméticamente para realizar la extracción hasta obtener el extracto.

Getting hydrolats: obtained from oregano, purple maguey and ginger (Table 1), both fresh plant (300 g L⁻¹ and 600 g L⁻¹) and dried (45 g L⁻¹ and 90 g L⁻¹) in two ratios (10:1 and 10:0). This process is carried out by washing, chopping and weighing the amount needed; then he was placed in the kettle of the distillation with the mixture corresponding to varying solvent and was sealed for extraction to obtain the extract.

Determination of the minimum inhibitory concentration (CMI): the means of PDA culture prepared in the required amount was used, sterilized along with the glass material

Cuadro 1. Peso de material vegetal y relación utilizada para la elaboración de los extractos.

Table 1. Weight of plant material and ratio used for the production of extracts.

Tratamiento	Peso de material vegetal (g L ⁻¹)	Estado de material vegetal	Relación agua-alcohol
O1, M1, J1	300	Fresco	10:1
O2, M2, J2	600	Fresco	10:1
O3, M3, J3	300	Fresco	10:0
O4, M4, J4	600	Fresco	10:0
O5, M5, J5	45	Seco	10:1
O6, M6, J6	90	Seco	10:1
O7, M7, J7	45	Seco	10:0
O8, M8, J8	90	Seco	10:0

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI): se utilizó el medio de cultivo PDA preparado en la cantidad necesaria, se esterilizó junto con el material de vidrio (Erlenmeyer de 50 mL y probetas de 50 mL) luego se vació el medio en placas de plástico estériles con una mezcla de PDA y extracto obtenido con agua en concentraciones de 50, 40, 30, 20 y 10% (V/V), y de cada una de estas concentraciones se tuvo cuatro repeticiones, además se contó con un testigo absoluto (PDA) y un testigo químico (polisulfuro de calcio). Posteriormente se sembró el hongo con ayuda de un sacabocados y las placas se mantuvieron en incubación a 23 °C \pm 2 °C.

Variables evaluadas: se evaluó el crecimiento micelial cada 24 h y se cuantificó la producción de conidias totales y germinadas de cada una de las placas, realizando un raspado en la superficie del micelio y efectuando las diluciones necesarias para contarlas en la cámara de Neubauer.

Diseño experimental y análisis estadístico. Los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar con 122 tratamientos y cuatro repeticiones. Se incluyó un

(Erlenmeyer 50 mL and specimens 50 mL) then the medium was poured into plastic dishes sterile with a mixture of PDA and extract obtained with water at concentrations of 50, 40, 30, 20 and 10% (V/V), and each of these concentrations four replications was also counted on an absolute control (PDA) and a chemical control (calcium polysulfide). Subsequently was seeded the fungus using a punch and the plates were kept in incubation at 23 °C \pm 2 °C.

Variables evaluated: mycelial growth every 24 h was assessed and the production of total conidium was quantified and germinated each of the plates, performing a scaling on the surface of the mycelium and making the necessary dilutions to count in Neubauer chamber.

Experimental design and statistical analysis. The treatments were distributed in a completely randomized design with 122 treatments and four replications. An absolute control and a chemical included, plus analysis of variance was performed to each of the variables evaluated and the comparison test of Tukey $p \leq 0.05\%$ was applied.

testigo absoluto y uno químico, además se realizó análisis de varianza a cada una de las variables evaluadas y se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey $p \leq 0.05\%$.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos para el extracto de orégano mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *M. roreri* y formación de conidias: totales y germinadas (Cuadro 2) a concentraciones de 50 y 40%. Los tratamientos O1, O2, O3, O5 y O6 presentaron inhibición de 100%, tanto para crecimiento micelial como para formación de conidias; en este caso la CMI fue de 40%. Estos datos ratifican los resultados obtenidos por Ramírez *et al.* (2011) quienes mencionan que el hidrolato de orégano al 50% inhibe completamente el patógeno.

Results and discussion

The results obtained for oregano extract showed inhibitory effect on the mycelial growth of *M. roreri* and formation of conidium: total and germinated (Table 2) at concentrations of 50 and 40%. Treatments O1, O2, O3, O5 and O6 showed 100% inhibition for both mycelial growth and for formation of conidium; in this case was 40% CMI. These data confirm the results obtained by Ramírez *et al.* (2011) who mentioned that the hydrolate 50% oregano completely inhibits the pathogen.

It is very important to note that to extract the greatest amount of metabolites present in the plant was necessary to use 300 g L⁻¹ (fresh plant) and the water-alcohol solvent (10:1), because by using dry material metabolites present in the plant apparently degraded. Similarly,

Cuadro 2. Efecto del extracto de orégano sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri*.
Table 2. Effect of oregano extract on mycelial growth and formation of conidium of *M. roreri*.

Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales (mL ⁻¹ x 10 ⁵)	Conidias germinadas (mL ⁻¹ x 10 ⁵)
O1 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	47.5 de	72.63 abc	0 a
20	48 de	132.01 bcde	0.08 a
10	48.75 de	147.16 bcdef	0.13 a
O2 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	50 e	71.66 abc	0 a
20	50 e	85 abcd	0 a
10	50 e	204.79 efgh	1.87 a
O3 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	48.5 de	167.38 cdef	0 a
20	48.5 de	190.86 defgh	0.08 a
10	49 de	206.61 efgh	0.08 a
O4 50	12.5 b	102.08 abcde	0 a
40	43.5 d	107.15 abcde	0 a
30	48 de	117.63 bcde	0 a
20	48 de	136.66 bcdef	0 a
10	47.75 de	187.81 defg	0.69 a
O5 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	48 de	39.51 ab	0 a
20	48.75 de	123.26 bcde	0 a
10	49 de	291.59 gh	0.69 a

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

Cuadro 2. Efecto del extracto de orégano sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri* (Continuación).
Table 2. Effect of oregano extract on mycelial growth and formation of conidium of *M. roreri* (Continuation).

Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales (mL ⁻¹ x 10 ⁵)	Conidias germinadas (mL ⁻¹ x 10 ⁵)
O6 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	46.75 e	0.41 a	0 a
20	47 de	130.55 bcde	0 a
10	48.5 de	243.63 fgh	0.19 a
O7 50	12.5 b	59.63 abc	0 a
40	23 c	60.12 abc	0 a
30	47.25 de	65.83 abc	0 a
20	47.25 de	168.95 cdef	0.2 a
10	48.25 de	205.5 efgh	0.34 a
O8 50	18.5 b	112.5 bcde	0 a
40	49 de	122.91 bcde	0 a
30	47.5 de	143.61 bcdef	0 a
20	47.75 de	283.29 gh	0.08 a
10	49.25 e	301.15 h	0.09 a
T. Absoluto	50 a	591.94 i	6.66 b
T. Químico	0 a	0 a	0 a

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

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. De la misma manera, Álvarez *et al.* (2008) evaluaron la influencia del método de secado de las hojas del género *Erythroxyllum confusum*, sobre la composición fitoquímica y variación de los metabolitos, recomendaron 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 50 y 40%; resultados que concuerdan con lo reportado por Ramírez *et al.* (2011) 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. 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*,

Álvarez *et al.* (2008) evaluated the influence of the method of drying the leaves of the genus *Erythroxyllum confusum* on the phytochemical composition and variation of metabolites, they recommended using drying in the shade of the plant material as a way to conserve resources and eliminate possible decomposition of metabolites.

The O4, O7 and O8 treatments allowed mycelial growth and conidium formation at all concentrations; however, oregano had an inhibitory effect on seed germination at 50 and 40%; results that are consistent with those reported by Ramírez *et al.* (2011) who mentioned that all extracts from oregano inhibited the formation of conidium between 100 and 71% although, as noted above, formation of mycelium appeared, therefore these extracts show antiesporulating activity. Cáceres *et al.* (2013) determined the inhibitory effect of clove *Eugenia caryophyllata*, cinnamon *Cinnamomum zeylanicum* and oregano variety *Lippia berlandieri* obtained by the technique of hydrodistillation on six major pathogens that attack food (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* and *Aspergillus niger*), the authors mention that the aqueous extract of oregano showed higher biological activity against fungi under study.

The comparing means (Tukey $p \leq 0.05$) showed differences between hydrolats oregano when compared with the chemical and absolute control, which recorded the highest

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.

La comparación de medias (Tukey $p \leq 0.05$) mostró diferencias entre los hidrolatos de orégano al compararlos con el testigo químico y absoluto, el cual registró el mayor valor de esporulación con 951.94×10^5 conidias totales mL^{-1} y 6.66×10^5 conidias germinadas mL^{-1} , el O1 mostró los mejores resultados ya que no presentó formación conidias; además de que el hidrolato obtenido en este tratamiento comparado con los demás tratamientos utilizó menos tiempo de destilación, eficientando con ello el tiempo y el consumo de energía requerida para su extracción. 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 *O. vulgare*, *T. vulgaris* K y *M. 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.

En el Cuadro 3 se aprecia el potencial antifúngico del extracto de maguay morado sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri*. Se aprecia que los tratamientos M1, M2, M5, M6 y M7 inhiben el crecimiento micelial del patógeno en 100% a 50 y 40%; por lo que CMI fue de 40%. Los tratamientos M3 y M4 a 50% presentan inhibición total del hongo; pero a concentraciones de 40%, presentaron porcentajes de inhibición de 52 a 70%. Con respecto al tratamiento M8, éste inhibió de 48 a 100% el crecimiento micelial del hongo a las cinco concentraciones evaluadas. El M1 fue el tratamiento que permitió mayor extracción de metabolitos, los cuales inhibieron el crecimiento micelial. Además, presentó el menor tiempo utilizado para obtener el extracto (2 h 46 min), comparado con los extractos elaborados con material seco.

La información generada demuestra que el maguay morado posee metabolitos capaces de inhibir el crecimiento del hongo causante de la enfermedad ya que su CMI fue de 40%; mejorando con ello los reportado por Ramírez *et al.* (2011) quienes mencionan que el hidrolato de maguay morado al 50% inhibe completamente el patógeno.

Pupo *et al.* (2010) mencionan que el maguay morado tiene potencial antifúngico frente al agente causal del tizón temprano del tomate (*Solanum lycopersicum*), ya

value of sporulation with 951.94×10^5 total conidium mL^{-1} and 6.66×10^5 germinated conidium mL^{-1} , the O1 showed the best results as it did not present conidiums training; besides the hydrolats obtained in this treatment compared to the other treatments used less time distillation, thereby efficiently time and energy required for extraction. According to Carrillo *et al.* (2010 reported by Kordal *et al.*, 2008) mention that the carvacrol and thymol are compounds of terpene units present in the essential oils of some species of the Lamiaceae family as *O. vulgare*, *T. vulgaris* K and *M. piperita*, of which we found acting causing alterations in morphology and hyphal aggregates, which causes growth and lysis reduce wall and cell membrane of the pathogen occurs.

In the Table 3 shows the antifungal potential of purple maguay extract on mycelial growth and formation of conidium of *M. roreri* seen. It is appreciated that the M1, M2, M5, M6 and M7 treatments inhibit mycelial growth of the pathogen in 100% at 50 and 40%; so CMI was 40%. The M3 and M4 treatments 50% have total inhibition of the fungus; but at concentrations of 40%, they showed inhibition rates of 52 to 70%. With regard to treatment M8, it inhibited from 48 to 100% mycelial growth of the fungus at five concentrations evaluated. The M1 was the treatment that allowed increased extraction of metabolites, which inhibited mycelial growth. Also presented the shortest time used to obtain the extract (2 h 46 min) compared to extracts made from dried material.

The information generated purple maguay shows that has able to inhibit the growth of disease-causing fungus metabolites because its CMI was 40%; I thereby improving reported by Ramírez *et al.* (2011) who mentioned that the purple maguay hydrolats at the 50% completely inhibits the pathogen.

Pupo *et al.* (2010) mention that the purple maguay has antifungal potential against the causative agent of early blight of tomato (*Solanum lycopersicum*), as the authors evaluated plant extracts eleven plants, including extracts *Cleome gynandra*, *Tradescantia pallida* (Rose) and *T. spathacea*, did not reach 10% inhibition with any of the doses used in the study. Therefore the data of these authors differ with the results obtained in this investigation.

With regard to the formation of totals and germinated conidium, it shows that there are significant differences ($p \leq 0.05$) between the treatments applied; that is M1, M2, M4, M5, M6 and M7 treatments show inhibition in the formation of total conidium germinated and at concentrations of 50 and 40%, the lowest value of the CMI (40%).

que los autores evaluaron extractos vegetales de once plantas, entre las cuales los extractos de *Cleome gynandra*, *Tradescantia pallida* (Rose) y *T. spathacea*, no alcanzaron 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.

The treatment M3 to 50% inhibited the formation of conidium, but in 40% concentration 2.69×10^5 total conidium mL^{-1} ; although in this case the conidium failed to form the germ tube. Treatment M8 shows that although formation of conidium was presented in a range of 52.69×10^5 to 180.62×10^5 total conidium mL^{-1} in five concentrations tested, fail to

Cuadro 3. Efecto del extracto de maguey morado sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de *M. roreri*.
Table 3. Effect of purple maguey extract on mycelial growth and formation of conidium of *M. roreri*.

Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales ($\text{mL}^{-1} \times 10^5$)	Conidias germinadas ($\text{mL}^{-1} \times 10^5$)
M1 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	47.5 f	80.58 abcdefg	0 a
20	48 ef	101.75 defghi	0.2 a
10	48.25 ef	156.94 ghi	0.5 a
M2 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	45.75 ef	12.77 abcd	0 a
20	46.5 ef	69.84 abcdef	0 a
10	49 ef	82.34 abcdefg	0.37 a
M3 50	0 a	0 a	0 a
40	15 b	2.69 a	0 a
30	22.25 c	5.41 ab	0 a
20	22.25 c	11.08 abcd	0 a
10	38.75 d	43.97 abcde	0 a
M4 50	0 a	0 a	0 a
40	24.00 c	0 a	0 a
30	45 e	0 a	0 a
20	47 ef	41.87 abcd	0 a
10	49 f	185.66 i	0 a
M5 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	50 f	7.77 abc	0 a
20	50 f	107.47 efghi	0 a
10	50 f	120.97 efghi	0.13 a
M6 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	48.25 ef	117.81 efghi	0 a
20	50 f	131.04 efghi	0 a
10	50 f	144 fghi	0 a
M7 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	48.5 ef	88.12 abcdefgh	0 a
20	49 ef	96.94 bcdefghi	0 a
10	49.25 ef	128.54 efghi	0 a
M8 50	26 c	52.36 abcdef	0 a
40	50 f	99.79 cdefghi	0 a
30	48 ef	110.09 efghi	0 a
20	50 f	122.31 efghi	0 a
10	50 f	180.62 hi	1.66 a
T. Absoluto	50 a	591.94 j	6.66 b
T. Químico	0 a	0 a	0 a

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

Con respecto a la formación de conidias totales y germinadas, se observa que hay diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos aplicados; 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 de su CMI (40%).

El tratamiento M3 a 50% inhibió la formación de conidias, pero a concentración de 40% presentó 2.69×10^5 conidias totales mL^{-1} ; aunque en este caso las conidias no lograron formar el tubo germinativo. 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 mL^{-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 mL^{-1} , y 6.66×10^5 conidias germinadas. 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%.

En el Cuadro 4 se detalla el efecto del extracto de jengibre frente al patógeno, los tratamientos J1, J2, J5 y J6 inhiben el crecimiento micelial al utilizar la relación 10:1, esto a 50 y 40%, con un porcentaje de inhibición de 100% siendo su CMI de 40%. Se observa que los tratamientos J3, J4, J7 y J8 presentan inhibición del crecimiento micelial en porcentajes que van del 0 a 58% a las cinco concentraciones; 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 la relación (10:1) 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 coinciden con los reportados por Nguetack *et al.* (2004), quienes evaluaron el efecto inhibitorio de extractos de *Cymbopogon citratus*, *Monodora myristica*, *Ocimum 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.

germinate, so do not allow the infection occurred pathogen in the fruit and likewise conidium production when compared to the absolute control which registered a value of 591.94×10^5 conidium mL^{-1} is reduced, and 6.66×10^5 conidium germinated. Purple maguey leaves used for the production of extracts had a humidity of 91%, these data are consistent with those reported by Reyes *et al.* (2009) who expressed the moisture from the fresh leaves of purple maguey is 91.5%.

In Table 4 the effect of ginger extract against the pathogen detailed, J1, J2, J5 and J6 treatments inhibit mycelial growth using the 10:1 ratio, that 50 and 40%, with a percentage of inhibition 100% being the CMI of 40%. It is noted that J3, J4, J7 and J8 treatments have mycelia growth inhibition percentages ranging from 0 to 58% at five concentrations; so the metabolites present in ginger were extracted in smaller quantities because water was used as solvent, added to the plant material was dried in the sun. Apparently J1 treatment that fresh plant material and the ratio (10:1) was used to obtain it was the most efficient in the extraction process, requiring a time in the distillation process 2 h 36 min. The results coincide with those reported by Nguetack *et al.* (2004), who evaluated the inhibitory effect of extracts of *Cymbopogon citratus*, *Monodora myristica*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* against three fungi food *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* finding that hydrolats of the five plants present metabolites that inhibit the growth and formation of conidium of the three fungi studied.

Furthermore, J1, J2, J5 and J6 treatment obtained 10:1 inhibited the formation and conidium germination at 50 and 40% and, J3, J4, J7, and J8 relative 10:0 registered 100% inhibition germinated conidium, although allowed the formation of conidium, however they are below the absolute total of conidium witness, whose value was 591.94×10^5 total conidium mL^{-1} . Ramírez *et al.* (2011) state that ginger hydrolats recorded as effectively as its CMI is the lowest 30%. Peña *et al.* (2004) show the effect of different plant extracts (garlic, ginger, neem, aloe, etc.) against *Thielaviopsis paradoxa* of pineapple, which causes black rot of the plant. Sivasothy *et al.* (2011) evaluated the essential oils obtained by hydrodistillation oregano leaves and rhizomes of the plant, finding that the oils obtained both leaf and rhizome *Zingiber officinale* var. *Rubrum* Theilade, have antibacterial activity against gram positive bacteria

Cuadro 4. Efecto del extracto de jengibre sobre el crecimiento micelial y formación de conidias de *M. royeri*.
Table 4. Effect of ginger extract on mycelial growth and formation of conidium of *M. royeri*.

Tratamiento	Crecimiento (mm)	Conidias totales (mL ⁻¹ x10 ⁵)	Conidias germinadas (mL ⁻¹ x10 ⁵)
J1 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	43.25 h	50.83 ab	0 a
20	45.5 h	107.5 bcde	0 a
10	45.75 h	99.25 bcde	0 a
J2 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	47.25 h	156.7 cdef3	0 a
20	49 h	162.91 def	0.06 a
10	49.75 h	170.34 ef	0.2 a
J3 50	22 c	75.9 abcd	0 a
40	32 de	83.4 abcde	0 a
30	44 h	101.52 bcde	0 a
20	47 h	217.08 fg	0 a
10	47.25 h	277.37 g	0.06 a
J4 50	31 de	41.75 b	0 a
40	33 defg	51.87 ab	0 a
30	41.75 fh	71.25 abcd	0 a
20	42 gh	82.08 abcde	0.04 a
10	42 gh	164.02 def	0.13 a
J5 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	48.75 h	63.88 abc	0 a
20	49.00 h	74.65 abcd	0 a
10	49.25 h	83.61 abcde	0 a
J6 50	0 a	0 a	0 a
40	0 a	0 a	0 a
30	48.5 h	24.44 ab	0 a
20	48.5 h	42.09 ab	0 a
10	49 h	80 abcde	0 a
J7 50	31 cde	24.16 ab	0 a
40	33 defg	67.36 abc	0 a
30	31.75 efgh	96.83 bcde	0 a
20	40.75 h	298.12 g	0 a
10	43 h	305.83 g	0 a
J8 50	21 b	77.22 abcd	0 a
40	29 bcd	88.47 abcde	0 a
30	47 h	115.62 bcde	0 a
20	47 h	170.41 ef	0 a
10	48 h	229.79 fg	0 a
T. Absoluto	50 h	591.94 h	6.66 b
T. Químico	0 a	0 a	0 a

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

Por otro lado, los tratamientos J1, J2, J5 y J6 obtenidos en relación 10:1 inhibieron la formación y germinación de conidias a 50 y 40% y, el J3, J4, J7, y J8 en relación 10:0

Bacillus cheniformis *Bacillus spizizenii* and *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas stutzeri*.

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, cuyo valor fue de 591.94×10^5 conidias totales mL^{-1} . Ramírez *et al.* (2011) afirman que el hidrolato de jengibre registró la mayor efectividad ya que su CMI es la más baja 30%. 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. Sivasothy *et al.* (2011) evaluaron los aceites esenciales de orégano 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* y bacterias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas stutzeri*.

Conclusiones

Los hidrolatos de orégano, maguey morado y jengibre a concentraciones de 50 y 40% tanto en planta fresca como material secado al sol, poseen metabolitos capaces de inhibir el crecimiento y formación de conidias del hongo de *M. roreri*. Tomando en cuenta que para la mejor extracción de sus metabolitos, las plantas estudiadas requieren alcohol y material vegetal fresco (300 g L^{-1}).

Para la extracción de los metabolitos de maguey morado que inhiban el crecimiento y desarrollo de *M. roreri* es posible realizarlo con agua como solvente, ya que inhibe igual que con solvente agua-alcohol (10:1).

Los hidrolatos de jengibre y orégano más eficaces en la inhibición del crecimiento y desarrollo de *M. 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).

Literatura citada

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.

Conclusions

The hydrolats oregano, ginger purple maguey and at concentrations of 50 and 40% both as fresh plant as a material drying in the sun, have metabolites with ability to inhibit growth and formation of conidium of the fungus *M. roreri*. Considering that for better extraction of metabolites, the studied plants require alcohol and fresh plant material (300 g L^{-1}).

For extraction of metabolites of purple maguey that inhibit the growth and development of *M. roreri* may do so with water as a solvent, since it inhibits solvent like water-alcohol (10:1).

The hydrolats ginger and more effective in inhibiting the growth and development of *M. roreri* oregano were obtained 300 g L^{-1} (fresh), 45 g L^{-1} and 90 g L^{-1} (dry) with a water solvent-alcohol (10:1).

End of the English version



- Barrera, N. y Bautista, B. 2008. Actividad antifúngica en polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*. Rev. Mex. Fitopatol. 26:27-31.
- Barros, N. O. 1982. Avances en la represión de la moniliasis del cacao. Colombia. 21:40-48.
- 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*. Rev. Mex. Fitopatol. 31(2):105-112.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 2010. Estudio de mercado cacao amigable con la biodiversidad de Centroamérica. Costa Rica. 198 p.
- 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. Agron. Colomb. 38(2):245-253.
- 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. Escuela de Fitotecnia, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Costa Rica. 14- 47.
- 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. 21 p.
- Hernández, L.; Bautista, B. y Velázquez, V. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades en poscosecha. Rev. Fitotec. Mex. 30(2): 119-123.
- López, O.; 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. Chiapas, México. 40 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. Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. Serie técnica: Informe técnico Núm. 28. 63 p.
- Meza, S. C. R., y León, V. 1972. Control químico de la moniliasis y mancha de agua del cacao. Rev. de la Facultad de Agronomía. 2(1):17.
- 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. Int. J. Food Microbiol. 329-334.
- 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. Rev. Fac. 21(1):188-192.
- Phillips, W. 2004. La moniliasis del cacao: Una serie amenaza para el cacao en México. Simposio Nacional de manejo fitosanitario de cultivos tropicales. México. 91-99 p.
- 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. Ecuador. 21-25 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*. Rev. Iberoam. Micol. 28(1):60.
- Ramírez, G. S. 2008. La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema de cacao en México. Tecnología en Marcha. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 21(1):91-110.
- Ramírez, S.; López, O.; Guzmán, T.; Munguía, S. y Espinosa, S. 2011. 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.* Rev. Tecnología en Marcha. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 24(2):1-6.
- Reyes, A.; Ezúara, E.; Beristain, C.; Cruz, F. y Vernon, E. 2009. Propiedades antioxidantes de maguey morado (*Rhoeo discolor*) purple maguey (*Rhoeo discolor*) antioxidant properties, CyTA. J. Food. 7(3):209-216.
- Reyes, L. y Marín, C. 1981. Un método de evaluación de antiesporulantes a *Moniliophthora roreri* Octava conferencia Internacional de investigación en cacao. Colombia. 429-431.
- Sánchez, J. A. 1982. Reacción de cultivares de cacao a la inoculación artificial con *Monilia roreri*. Tesis M. Sc. Universidad de Costa Rica - Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 55 p.
- SAGARPA. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. (SIAP). 2014. Producción agrícola. <http://www.siap.gob.mx/index>.
- Sivasothy, Y.; Keng, W.; Hamid, A.; Eldeen, I.; Farizza, S. and Awang, K. 2011. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *Rubrum Theilade* and their antibacterial activities. 124:514-517.
- Vergara, R. 1997. De la agricultura tradicional a la agricultura biológica. Memorias seminario regional. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 241 p.