

EFFECTO *IN VITRO* DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA LA MONILIASIS (*Moniliophthora roreri*) DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.)

María Cristina Arcos-Méndez^{1*}, Luciano Martínez-Bolaños², Gonzalo Ortiz-Gil², Misael Martínez-Bolaños³ y Carlos Hugo Avendaño-Arrazate³

¹Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria Sursureste. Carrera Ingeniero Agrónomo Especialista en Zonas Tropicales. Academia de Recursos Fitogenéticos. Laboratorio de Fitosanidad Tropical. Orientación Terminal de Producción de Plantas Ornamentales Tropicales. Puyacatengo, Teapa, Tabasco, México. C.P. 86800.

²Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria Sursureste. Academia de Recursos Fitogenéticos. Laboratorio de Fitosanidad Tropical. Puyacatengo, Teapa, Tabasco, México. C.P. 86800.

³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campus Experimental Rosario Izapa. Tuxtla Chico, Chiapas.

*Autora para la correspondencia: cristinaarcos96@hotmail.com.

RESUMEN

Bajo condiciones *in vitro* se evaluó el efecto de extractos vegetales en el control de aislados de moniliasis (*Moniliophthora roreri*), obtenidos de frutos enfermos de cacao colectados del estado de Tabasco, México. Se evaluaron 48 tratamientos (ocho extractos de especies vegetales, esterilizadas y no esterilizadas, a tres concentraciones 8, 16 y 25 % y el testigo absoluto) en medio de cultivo PDA, con cuatro repeticiones, y distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los extractos se elaboraron con tejido vegetal seco y pulverizado disueltos en agua destilada-estéril, y bajo tratamiento hidrotérmico de 60 °C, agitación constante de 50 rpm durante 24 h. Los tratamientos inoculados con el hongo se incubaron a 28 °C y el crecimiento del patógeno se registró cada 24 horas. Después de 15 días de la aplicación de tratamientos, los extractos sin esterilizar de *Citrus x paradisi*, *Pimienta dioica*, *Origanum majorana*, *Tilia platyphyllos* con y sin esterilizar, a una concentración del 25 %, presentaron el 100 % de inhibición del hongo *M. roreri*, mientras que en el testigo presentó un radio de crecimiento de 25 mm.

Palabras clave: cacao, extractos vegetales, *Moniliophthora roreri*.

IN VITRO EFFECT OF VEGETABLE EXTRACTS AGAINST MONILIASIS (*Moniliophthora roreri*) OF COCOA (*Theobroma cacao* L.)

ABSTRACT

Under *in vitro* conditions, the effect of plant extracts in the moniliasis control isolates (*Moniliophthora roreri*) obtained from cacao sick fruits collected from the state of Tabasco, Mexico was evaluated. 48 treatments (eight extracts of plant species, sterilized and non-sterilized, at three concentrations 8, 16 and 25 % and the absolute control) were evaluated in PDA culture medium with four replications, and distributed in a completely randomized experimental design. The extracts were made with dry and powdered plant tissue dissolved in distilled-sterile water, and under hydrothermal treatment of 60 °C, constant stirring of 50 rpm for 24 h. The inoculated treatments with the fungus were incubated at 28 °C and the pathogen growth was recorded every 24 hours. After 15 days of treatment applications, the unsterilized extracts of *Citrus x paradisi*, *Dioic pepper*, *Origanum majorana*, *Tilia platyphyllos* with and without

sterilization, at a concentration of 25 %, presented 100 % inhibition of the fungus *M. royeri*, while in the control it had a growth radius of 25 mm.

Keywords: cocoa, vegetable extracts, *Moniliophthora royeri*.

INTRODUCCIÓN

El cacao es un cultivo tropical con alta importancia cultural y económica en el sureste mexicano, con reconocimiento internacional dada la calidad de materia prima para la producción de chocolate. En el mundo se produce más de 4 millones de toneladas de grano de cacao, las cuales se encuentran distribuidas entre los principales productores: Costa de Marfil (33 %), Ghana (19 %), Indonesia (15 %), Camerún (7 %), Nigeria (5 %), Brasil (5 %) y Ecuador (4 %) (FAO, 2016).

México participa con menos del 1 % mundial con 26 mil toneladas, ocupando el decimotercer lugar con 58, 734 ha distribuidas en los estados de Tabasco (64 %), Chiapas (35 %) y Guerrero (1 %) (SIAP, 2017).

Uno de los principales problemas que afectan al cultivo de cacao en el mundo, son las infecciones causadas por el hongo fitopatógeno *Moniliophthora royeri* (Lugo *et al.*, 2016), que produce moniliasis, una enfermedad que destruye la mazorca de cacao (*Theobroma cacao* L.) y, por tanto, reduce la producción del cultivo y los ingresos de los agricultores (Suárez, 2016), ocasionando la decadencia en producción de las zonas cacaoteras en el sureste mexicano.

En México, la moniliasis fue reportada en 2005, se detectó en la región Norte del estado de Chiapas y se dispersó a todas las áreas productoras de cacao (Torres de la Cruz, 2017), y actualmente es la causa más importante de la baja productividad se estima que las pérdidas actuales rondan al 50 % de la producción (Phillips, 2017). Las pérdidas de los cacaotales del Golfo de México son mayores a las del Pacífico; teniendo rango de pérdida superior hasta del 75 % de la producción anual, principalmente por la combinación del ataque tanto de la moniliasis (*M. royeri*) como de la mancha negra (*P. capsici*) y al largo periodo húmedo que impera en dicha zona (Ortiz, 2017).

A pesar de las alternativas de manejo que se han implementado para minimizar la incidencia de este problema fitosanitario, la poca capacitación de los productores, los bajos recursos económicos, y la falta de un manejo integral con resultados satisfactorios no han logrado reducir el impacto de la enfermedad, por ellos se propone nuevas alternativas de control de bajo impacto ambiental como el uso de extractos vegetales.

Los extractos de origen vegetal se caracterizan por la presencia de determinados metabolitos secundarios los cuales forman parte de las estrategias defensivas de las plantas (Celis *et al.*, 2009), su obtención es una opción que puede contribuir al manejo de la moniliasis del cacao y ser fácilmente elaborado por los productores.

Por lo anterior, en el presente estudio se evaluó *in vitro*, el efecto de extractos vegetales en el control de aislados de moniliasis (*Moniliophthora royeri*) obtenidos de frutos de cacao con síntomas de la enfermedad colectados del estado de Tabasco, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en San José Puyacatengo, Teapa, Tabasco, en el Laboratorio de Fitosanidad Tropical de la Universidad Autónoma Chapingo. Se utilizaron ocho plantas diferentes con uso etnobotánico medicinal (Tabla 1), los cuáles fueron colectados en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz.

Elaboración de extractos vegetales

Tabla 1. Caracterización de especies vegetales utilizadas para la elaboración de extractos vegetales contra *M. roreri*.

Familia	N. científico	N. común	Parte utilizada	Cantidad de polvo	Cantidad de agua destilada	Cantidad de extracto obtenido
<i>Cucurbitaceae</i>	<i>Momordica charantia</i>	Cundeamor	Hoja	50 g	290 ml	203 ml
<i>Lamiaceae</i>	<i>Origanum majorana</i>	Mejorana	Hoja	35 g	160 ml	88 ml
<i>Malvaceae</i>	<i>Tilia platyphyllos</i>	Tila	Hoja	35 g	120 ml	56 ml
<i>Myrtaceae</i>	<i>Pimenta dioica</i>	Pimienta	Fruta y semilla	35 g	120 ml	67 ml
<i>Rutaceae</i>	<i>Citrus x paradisi</i>	Arbol de pomelo	Hoja	50 g	260 ml	157 ml
<i>Rutaceae</i>	<i>Ruta graveolens</i>	Ruda	Hoja	35 g	200 ml	124 ml
<i>Urticaceae</i>	<i>Urtica dioica</i>	Hierba amarga	Hoja	40 g	230 ml	153 ml
<i>Verbenaceae</i>	<i>Lantana camara</i>	Cinco negros	Hoja	50 g	200 ml	148 ml

Los extractos se elaboraron con tejido vegetal seco y pulverizado disueltos en agua destilada-estéril, y bajo tratamiento hidrotérmico de 60 ° C, agitación constante de 50 rpm durante 24 h.

Aislamiento del patógeno

A partir de frutos con síntomas de daño provocados por el hongo *M. roreri*, colectados de San Pablo Tamborel, Teapa, Tabasco, se realizó un corte cuadrangular de aproximadamente 3 mm; se lavaron con agua durante 15 minutos, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito al 1 % durante 2 minutos, finalmente se lavó con agua estéril. Una vez esterilizado el material se procedió a la siembra en cajas Petri en cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a 28 °C por 12 días.

Desarrollo de bioensayos

El ensayo *in vitro* se evaluó en dos grandes grupos: esterilizadas (A) y no esterilizadas (B), a las primeras se les añadió la concentración de extracto a evaluar y fueron esterilizadas en la autoclave, previo al vaciado en placas de Petri. Al segundo grupo se añadieron las diferentes dosis de extractos después de esterilizar los medios de cultivo y se procedió para ambos casos la siembra del hongo.

Se evaluó un total de 48 tratamientos a concentraciones del 8, 16 y 25 % y el testigo absoluto en medio de cultivo PDA, con cuatro repeticiones, y distribuidos en un diseño experimental completamente al azar.

Los tratamientos inoculados con el hongo se incubaron a 28 °C, el efecto inhibitorio se cuantificó mediante la medición del crecimiento radial del micelio del patógeno, cada 24 horas, durante 15 días.

Para determinar los efectos de los tratamientos estudiados, a los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y para determinar las diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de medias Tukey $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto de los extractos vegetales se evaluó durante 15 días, en donde se observó una reducción del crecimiento micelial del hongo en relación al tipo de extracto vegetal y dosis evaluada.

El extracto a base de *P. dioica* no presentó diferencias significativas durante el control en sus dos formas estériles y no estériles, mientras que a dosis altas (16 y 25 %) presentó la inhibición total del crecimiento (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de extractos vegetales en el crecimiento micelial del hongo *M. roleri*, en tres concentraciones (1, 2, 3) con y sin esterilización a los 15 días después de la inoculación (Tukey $p < 0,05$).

Especie vegetal	Esterilizado				No esterilizado		
	Control (T)	1	2	3	1	2	3
<i>Citrus x paradisi</i>	25 abcd	25.250 abc	25.750 ab	25.750 ab	-	-	0.000 k
<i>Lantana camara</i>	25 abcd	24.000 abcd	23.500 abcd	21.250 de	-	-	-
<i>Momordica charantia</i>	25 abcd	21.875 bcd	21.500 cd	23.000 abcd	-	-	-
<i>Urtica dioica</i>	25 abcd	25.750 ab	25.750 ab	18.250 ef	25 abcd	8.667 i	-
<i>Origanum majorana</i>	25 abcd	25.750 ab	26.000 a	25.250 abc	-	-	0.000 k
<i>Pimienta dioica</i>	25 abcd	25.000 abcd	9.500 i	0.000 k	-	-	0.000 k
<i>Ruta graveolens</i>	25 abcd	15.750 fg	10.750 hi	13.500 gh	-	-	-
<i>Tilia platyphyllos</i>	25 abcd	4.500 j	3.500 j	0.000 k	-	-	2.750 jk
Control (T)	25 abcd	25 abcd	25 abcd	25 abcd	25 abcd	25 abcd	25 abcd

Dosis (1) al 8 %, (2) 16 % y (3) 25 %. Valores con letras diferentes en las filas son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Las especies de *Citrus x paradisi* y *O. majorana* únicamente mostraron control en su forma no esterilizada, los tratamientos estériles mostraron un crecimiento similar al Testigo (control), en base a lo anterior es posible que durante el proceso de esterilización se pierdan los metabolitos secundarios que controlan el patógeno.

El extracto a base de *T. platyphyllos* causó la inhibición del crecimiento micelial del hongo en las tres formas estériles y en la dosis alta no estéril. Además, presentó mayor control del patógeno cuando fue sometida al proceso de esterilización.

En cuanto al extracto a base de *Urtica dioica* la dosis baja (8 %) en su forma estéril y no estéril, y dosis al 16 % en su forma estéril, presentó un crecimiento similar al Testigo (control), mientras que el extracto al 16 % en su forma no estéril presentó mayor cantidad de inhibición en el crecimiento del patógeno.

El extracto a base de *R. graveolens* no presentó diferencias significativas durante el control de *M. roleri*. Los tratamientos a base de ruda sin esterilizar se contaminaron, para esta especie el proceso de esterilización aumentó su efectividad, debido a que el extracto en sus tres formas estériles si mostraron diferencias significativas respecto al Testigo.

Los extractos a base de las especies de *L. camara* y *M. charantia* en sus formas estéril y no estéril no presentaron diferencias significativas en el control del patógeno, mostraron un crecimiento para *M. roleri* similar al Testigo.

Según Ramírez (2013), los extractos de *P. dioica* obtenidos de la hoja y las semillas por el método de extracción de hidrolato y presurizado, a una concentración del 50 % mediante el método de difusión en Agar, inhibieron totalmente el crecimiento del patógeno. En este estudio los extractos a base de *P. dioica* con una dosis del 25 % en su forma estéril y no estéril presentaron inhibición total en el crecimiento del patógeno (100a), presentado así diferencias significativas respecto al Testigo (control). La dosis al

8 % y 16 % mostraron un control de 5 % y 62 % de inhibición en el crecimiento micelial del hongo, respectivamente.

Los extractos a base de *Citrus x paradisi* y *O. majorana* presentaron inhibición total del crecimiento de *M. roreri*, en su forma no estéril (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de extractos vegetales en el porcentaje de inhibición (%) de *M. roreri* en tres concentraciones (1, 2, 3) con y sin esterilización a los 15 días después de la inoculación (Tukey $p < 0,05$).

Especie vegetal	Esterilizado			No esterilizado			
	Control (T)	1	2	3	1	2	3
<i>Citrus x paradisi</i>	0 h	0 h	1 h	0 h	-	-	100 a
<i>Lantana camara</i>	0 h	5 gh	7 gh	15 g	-	-	-
<i>Momordica charantia</i>	0 h	12.5 gh	14 gh	8 gh	-	-	-
<i>Urtica dioica</i>	0 h	0 h	0 h	27 f	1.3 h	65.3 c	-
<i>Origanum majorana</i>	0 h	0 h	0 h	0 h	-	-	100 a
<i>Pimienta dioica</i>	0 h	5 gh	62 c	100 a	-	-	100 a
<i>Ruta graveolens</i>	0 h	37 ef	57 cd	46 de	-	-	-
<i>Tilia platyphyllos</i>	0 h	82 b	86 b	100 a	-	-	89 ab
Control (T)	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h

Dosis (1) al 8 %, (2) 16 % y (3) 25 %. Valores con letras diferentes en las filas son estadísticamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Todos los tratamientos a base de *Tilia platyphyllos* presentaron diferencias significativas respecto al testigo (control), a una dosis alta estéril y no estéril inhibieron al 100 % el crecimiento del hongo (100a). Mientras que los extractos esterilizados a dosis del 8 y 16 %, presentaron una inhibición del 82 y 86 %, respectivamente. No se ha reportado estudios sobre la actividad fungistática en moniliasis de esta especie o en algún otro hongo, pero si hay antecedentes sobre sus propiedades antibactericidas por contener el compuesto eugenol (Rios, 2017).

El extracto de *R. graveolens* ha demostrado inhibir el crecimiento micelial desde un 53 hasta 81 % en cepas de *Trichoderma* (Reyes, et al., 2014). Para *M. roreri* la especie *Ruta graveolens* sus diferentes dosis en su forma estéril presentó diferencias significativas respecto al testigo (control), e inhibió el crecimiento micelial hasta el 57 % (57cd).

El extracto a base de *Urtica dioica* a una dosis del 16 % en su forma no estéril, causó la inhibición del crecimiento del hongo en un 65,3 % (65,3c). Por otra parte, Villancís (2017) encontró que *Urtica dioica* obtenida mediante la técnica arrastre de vapores mostró una inhibición de 12,94 % del crecimiento del patógeno de la antracnosis (*C. acutatum*).

Las especies de *L. camara* y *M.charantia* no presentaron inhibición significativa del crecimiento micelial de *M. roreri*, la mortalidad fue muy baja, casi similar al testigo.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio *in vitro* muestran una efecto altamente significativo de los extractos de *P. dioica* y *T.platyphyllos* en el control de *M. roreri*, según el estudio realizado muestran propiedades antifúngicas que presentan potencial para un estudio

más detallado en campo. Las demás especies lograron inhibir el patógeno en menor proporción, por lo que es importante ampliar las investigaciones a nuevas especies vegetales para fortalecer las alternativas de bajo impacto ambiental.

AGRADECIMIENTOS

A México y a los productores de cacao, a la Universidad Autónoma Chapingo, al INIFAP, y al proyecto SAGARPA-CONACyT (2017-02) por proveer el soporte financiero para este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- CELIS, A.; C. MENDOZA F., y M.E. PACHÓN. 2009. Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses. En: Temas agrarios: 5-16.
- FAO. 2016. Food and Agriculture organization. Organization of the United Nations. Faostat. En: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/S>.
- LUGO VARGAS, A.F.; D. TARRA JARRAMILLO; M.N. NIETO GUZMÁN y J. MALDONADO RODRÍGUEZ. 2016. Caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico del fruto de *Bromeliapinuin* y evaluación de su actividad antifúngica frente a un hongo aislado del fruto del cacao (*Theobroma cacao* L.) en estado de pudrición. *Revista de Investigaciones Universidad de Quindío*, 28(2): 49-56.
- ORTIZ G., C.F. 2017. Situación de las enfermedades del cacao y manejo en México, en presencia de moniliasis. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (1) Suplemento.
- PHILLIPS-MORA, W. 2017. Biología de la moniliasis del cacao y desarrollo de genotipos resistentes. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (1) Suplemento.
- RAMÍREZ G., S.I. 2013. Efectividad de extractos vegetales en el manejo de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. 71 p.
- REYES Q., C.K.; D. MARTINEZ C.; P. MORALES A.; M. SOBAL C.; A.H. ESCUDERO y J.G. AVILA. 2014. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(8), 1433-1446.
- RÍOS R., L.P. 2017. Determinación del rendimiento y caracterización fitoquímica del extracto etanólico de tilo (*Tilia platyphyllos* Scop.), obtenido de la hoja y flor proveniente del departamento de Chimaltenango, evaluado a escala laboratorio por medio de maceración dinámica. 182 p.
- SIAP, 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>
- SUÁREZ C., L.Y. 2016. Identificación molecular de aislamientos de *Moniliophthora roreri* en huertos de cacao de Norte de Santander, Colombia. *Acta agronómica*, 65(1):51-57.
- TORRES de la CRUZ, M. 2017. Epidemiología de la moniliasis del cacao en Tabasco y norte de Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (1).
- VILLACÍS A., L. AI.; O. LEÓN G.; R. SANTANA M.; J. MANGUI T.; G. CARRANZA y P. PAZMIÑO M. 2017. Actividad anti fúngica (*in vitro*) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(1):59-64.