



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE MANZANILLA, AJO,  
LLANTÉN, ORÉGANO, RUDA EN EL CONTROL DE MONILIOPTHORA  
RORERI A NIVEL IN VITRO

BERNAL MORALES JHON FERNANDO  
INGENIERO AGRÓNOMO

MACHALA  
2021



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE  
MANZANILLA, AJO, LLANTÉN, ORÉGANO, RUDA EN EL  
CONTROL DE MONILIOPTHORA RORERI A NIVEL IN VITRO

BERNAL MORALES JHON FERNANDO  
INGENIERO AGRÓNOMO

MACHALA  
2021



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE MANZANILLA, AJO, LLANTÉN,  
ORÉGANO, RUDA EN EL CONTROL DE MONILIOPTHORA RORERI A NIVEL IN  
VITRO

BERNAL MORALES JHON FERNANDO  
INGENIERO AGRÓNOMO

JARAMILLO AGUILAR EDWIN EDISON

MACHALA, 26 DE ABRIL DE 2021

MACHALA  
2021

# EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE MANZANILLA, AJO, RUDA Y LLANTÉN SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL DE MONILIOPTHORA RORERI A NIVEL IN VITRO.

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

<b>1</b> %	%	<b>1</b> %	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

---

## FUENTES PRIMARIAS

---

<b>1</b>	<b>Alvaro Celis, Cristina Mendoza, Marco Eduardo Pachón. "Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses", Temas Agrarios, 2018</b>	<b>1</b> %
	Publicación	

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 50 words

Excluir bibliografía

Activo

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, BERNAL MORALES JHON FERNANDO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE MANZANILLA, AJO, LLANTÉN, ORÉGANO, RUDA EN EL CONTROL DE MONILIOPTHORA RORERI A NIVEL IN VITRO, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

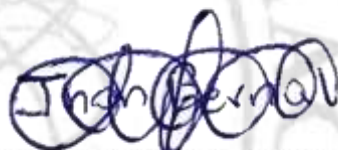
El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 26 de abril de 2021



BERNAL MORALES JHON FERNANDO  
0704628965

## **DEDICATORIA**

Este logro alcanzado va dedicado para DIOS y mis padres que han sido los pilares fundamentales en mi vida. Y en especial a mi mamá Rosa Morales quien me apoyo en todo momento y nunca dejo de creer en mí , a mis hermanos que fueron el soporte de muchos momentos difíciles que lo afrontaron siempre conmigo , un abrazo al cielo y un agradecimiento especial a mi papa Juan Bernal por cuidarme y bendecirme ese ángel que no está presente de forma física pero espiritualmente siempre está conmigo y a las personas que no creían en mí ,pues también va dedicado por todas la veces que me decían que me rindiera, tenía una razón más para salir adelante.

Este trabajo es el esfuerzo y la dedicación, las enseñanzas y aprendizajes adquiridos a lo largo de mi carrera estudiantil me han demostrado que estoy capacitado para grandes cosas y grandes éxitos.

## **AGRADECIMIENTO**

Gracias a dios por permitirme culminar una etapa más en mi vida, con salud y con sabiduría para saber afrontar todo obstáculo que se presenta en el camino y saberlos sobrellevar de una manera positiva siempre.

Agradezco a mi mamá Rosa Morales por darme el apoyo y el cariño para terminar mi carrera, gracias por toda mamá estoy muy orgulloso de ser tu hijo y que tu seas mi mamá. A mis hermanos Diana y Juan quiero agradecerles por siempre estar conmigo y ayudarme en los momentos que los necesitaba.

Quiero agradecer a mi tutor el Ing. Edison Jaramillo por transmitir sus conocimientos y ayudarme en el desarrollo de mi tesis, con sus aportes técnicos y con su amistad.

A mi enamorada Pia Orellana agradecerle por la ayuda brindada y por el apoyo en los momentos que más la necesite. A mi amigo Aldo Mora quiero agradecerle por siempre ser un apoyo dentro y fuera del aula, gracias a su apoyo incondicional en todo momento.

# **EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE MANZANILLA, AJO, RUDA Y LLANTÉN SOBRE EL CRECIMIENTO MICELIAL DE MONILIOPTHORA RORERI A NIVEL IN VITRO.**

**Autor**

Jhon Fernando Bernal Morales

**Tutor**

Ing. Edison Jaramillo

## **RESUMEN**

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es una planta originaria de América, pertenece al género theobroma. A nivel mundial la producción de cacao anualmente es de 4.3 millones de toneladas de grano de cacao de los cuales están distribuidas 74.9% concentrado en África Occidental 12.1% en el sureste asiático y 13% en América latina. Los principales productores de cacao en América Latina son Brasil, Ecuador, Perú, Colombia, Venezuela, y Trinidad & Tobago. El sector cacaotero creció en un 10% y las exportaciones alcanzaron 260 mil toneladas métricas (87% grano y 13% productos derivados). En el Ecuador la producción de cacao se localiza en 23 de las 24 provincias. Las principales enfermedades en América latica que atacan a las plantaciones de cacao son: la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y la moniliasis (*Moniliophthora roreri*, en el Ecuador la escoba de bruja afecto un 60 a 70% de la producción, y la moniliasis provoco perdidas hasta de un 80% en plantaciones cacaoteras. La moniliasis del cacao es una enfermedad causada por el hongo (*Moniliophthora roreri*). Su sintomatología comienza con las esporas del hongo atacan a los frutos dependiendo de la edad y condiciones ambientales provocando deformaciones, manchas color marrón cubiertas con un micelio blanco, marchitez y necrosis del fruto completamente. Los principales controles para moniliasis que se ponen en práctica son el control cultural, químico y biológico. Para presentar una propuesta a la problemática sobre el uso indebido de fungicidas menos contaminantes y que beneficien al medio ambiente, se propone el uso de extractos botánicos para el control de enfermedades causada por fitopatógenos, las cuales generan metabolitos secundarios que forman estrategias de acción para inhibir el ataque de hongos. El objetivo planteado en el presente ensayo es: Determinar el mejor extracto etanólico que inhiba el crecimiento micelial del hongo M. roreri a nivel in vitro. Las plantas utilizadas



fueron: Llantén (*Plantago major*), Ajo (*Allium sativum*), Ruda (*Ruta graveolens*) y Manzanilla (*Chamaemelum nobile*), con las plantas descritas se quería evidenciar una respuesta antifúngica sobre el hongo *M. roreri*. El estudio se realizó en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Técnica de Machala. Lo primero que se realizó en el ensayo fue el aislamiento y purificación del hongo *M. roreri* durante 14 días. Luego se procedió al secado de las plantas en la estufa durante 48 horas a 60°C excepto el ajo que se utilizaron los bulbos y fueron triturados. La maceración de los extractos botánicos fue durante 48 horas se colocaron en recipientes de plástico con capacidad de un litro, 40 gr de extracto seco + 80ml de alcohol al 96% pureza, logrando una relación 1:2 (P/V). Se preparó 600ml de medio de cultivo papa-destroza-agar (PDA), se pesó 24gr de PDA, y se adiciona al medio 60 mg de antibiótico (clorofenicol), luego con la ayuda de una probeta se midió 99ml de PDA que fueron distribuidas en 6 botellas de vidrio 20 minutos para su esterilización. se realizaron 6 tratamientos donde la variable de estudio fue el crecimiento radial del hongo se dividieron en T1(99ml de PDA testigo absoluto); T2 (99ml de PDA+ 1cc de alcohol al 96%), y los tratamientos T3, T4, T5yT6 con (99 ml de PDA+ 1cc de extracto etanólico botánico) de cada planta. En condiciones controladas de laboratorio el tratamiento T6 (Extracto etanólico Manzanilla) es estadísticamente superior al resto de los tratamientos. Le sigue en orden de eficacia el T3(Extracto etanolico Ruda) y T5(Extracto etanolico ajo) los tratamientos T4(Extracto etanolico llantén) y T2(testigo con alcohol 1%) son estadísticamente iguales al T1(testigo), es decir no tuvieron un efecto sobre el crecimiento micelical del hongo (*Moniliophthora roreri*). El tratamiento 1(testigo sin alcohol) y el tratamiento 2(testigo con alcohol al 1%), no presentaron diferencias estadísticas, por lo tanto, el alcohol no interfirió en el crecimiento micelial del hongo. En base a los resultados evidenciados en este estudio se recomienda realizar aplicaciones en campo de Extracto etanólico Manzanilla para el control del hongo *M. roreri* agente causal de la enfermedad moniliasis, y realizar más estudios con especies botánicas que respalden el uso de extractos etanólicos como alternativas de control cultural para el manejo de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.

**Palabras claves:** moniliasis, extractos, fitopatógenos, *Theobroma cacao*

# **EVALUATION OF ETHANOLIC EXTRACTS OF CHAMOMILE, GARLIC, RUDA AND LLANTÉN ON THE MYCELLIAL GROWTH OF MONILIOPTHORA RORERI AT THE IN VITRO LEVEL.**

**Author**

Jhon Fernando Bernal Morales

**Tutor**

Ing. Edison Jaramillo

## **ABSTRACT**

Cacao (*Theobroma cacao* L.) is a plant native to America, it belongs to the genus *theobroma*. Worldwide, annual cocoa production is 4.3 million tons of cocoa beans, of which 74.9% are distributed, concentrated in West Africa, 12.1% in Southeast Asia and 13% in Latin America. The main cocoa producers in Latin America are Brazil, Ecuador, Peru, Colombia, Venezuela, and Trinidad & Tobago. The cocoa sector grew by 10% and exports reached 260 thousand metric tons (87% grain and 13% derived products). In Ecuador, cocoa production is located in 23 of the 24 provinces. The main diseases in Latin America that attack cocoa plantations are: witch's broom (*Moniliophthora perniciosa*) and moniliasis (*Moniliophthora roreri*, in Ecuador, the witch's broom affected 60 to 70% of production, and moniliasis caused losses of up to 80% in cocoa plantations. Cacao moniliasis is a disease caused by the fungus (*Moniliophthora roreri*). Its symptoms begin with the spores of the fungus attack the fruits depending on the age and environmental conditions causing deformations, brown spots covered with a white mycelium, wilting and necrosis of the fruit completely. The main controls for moniliasis that are put into practice are cultural, chemical and biological control. To present a proposal to the problem of the misuse of less polluting fungicides that benefit the environment, the use of botanical extracts is proposed for the control of diseases caused by phytopathogens, which generate secondary metabolites that form action strategies to inhibit fungal attack. The objective set out in this test is: To determine the best ethanolic extract that inhibits the mycelial growth of the *M. roreri* fungus at the in vitro level. The plants used were: Plantain (*Plantago major*), Garlic (*Allium sativum*), Ruda (*Ruta graveolens*) and Chamomile (*Chamaemelum nobile*), with the described plants we wanted to show an antifungal response on the *M. roreri* fungus. The study was carried out in the plant pathology

laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences belonging to the Technical University of Machala. The first thing that was carried out in the test was the isolation and purification of the *M. roleri* fungus for 14 days. Then the plants were dried in the oven for 48 hours at 60°C except for the garlic, the bulbs were used and were crushed. The botanical extracts were macerated for 48 hours and were placed in plastic containers with a capacity of one liter, 40 g of dry extract + 80 ml of alcohol at 96% purity, achieving a 1: 2 (P / V) ratio. 600ml of potato-destroyer-agar (PDA) culture medium was prepared, 24gr of PDA was weighed, and 60 mg of antibiotic (chlorophenicol) is added to the medium, then with the help of a test tube 99ml of PDA was measured and distributed in 6 glass bottles 20 minutes for sterilization. 6 treatments were carried out where the study variable was the radial growth of the fungus. They were divided into T1 (99ml of absolute control PDA); T2 (99ml of PDA + 1cc of 96% alcohol), and the treatments T3, T4, T5yT6 with (99 ml of PDA + 1cc of botanical ethanolic extract) of each plant. Under controlled laboratory conditions, the T6 treatment (Chamomile ethanolic extract) is statistically superior to the rest of the treatments. It is followed in order of effectiveness by T3 (Ruda ethanol extract) and T5 (Garlic ethanol extract), treatments T4 (Plantain ethanol extract) and T2 (control with 1% alcohol) are statistically equal to T1 (control), that is, they did not have an effect on the mycelial growth of the fungus (*Moniliophthora roleri*). Treatment 1 (control without alcohol) and treatment 2 (control with 1% alcohol) did not present statistical differences, therefore, alcohol did not interfere with the mycelial growth of the fungus.

**Keywords:** moniliasis, extracts, phytopathogens, *Theobroma cacao*

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	15
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	18
2.1.	Origen.....	18
2.2.	Taxonomía.....	18
2.3.	Descripción botánica.....	19
2.3.1.	Tallo.....	19
2.3.2.	Hojas.....	19
2.3.3.	Flores.....	19
2.3.4.	Fruto.....	19
2.3.5.	Semillas.....	20
2.4.	Producción.....	20
2.4.1.	Producción mundial.....	20
2.4.2.	Producción nacional.....	20
2.5.	Tipos de cacao.....	20
2.5.1.	Criollo o nativo.....	21
2.5.2.	Forastero.....	21
2.5.3.	Trinitario.....	21
2.6.	Principales enfermedades que afectan al cultivo de cacao.....	22
2.6.1.	Escoba de bruja.....	22
2.6.2.	Mazorca negra.....	22
2.6.3.	Monilia.....	23
2.7.	<i>Moniliophthora roreri</i> .....	23
2.7.1.	Taxonomía.....	24
2.7.2.	Agente causal.....	24
2.7.3.	Sintomatología.....	24
2.7.4.	Ciclo de la enfermedad.....	25
2.7.5.	Tipos de controles.....	26
2.8.	Efecto de Extractos vegetales en control fúngico de enfermedades.....	27
2.8.1.	Llantén ( <i>Plantago major</i> ).....	28
2.8.2.	Ajo ( <i>Allium sativum</i> ).....	28
2.8.3.	Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> ).....	29

2.8.4.	Manzanilla ( <i>Chamaemelum nobile</i> ).....	29
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1.	Ubicación.....	31
3.2.	Materiales y equipos.....	31
3.2.1.	Equipos de laboratorio.....	31
3.2.2.	Materiales de laboratorio.....	31
3.2.3.	Material vegetativo.....	32
3.3.	Metodología.....	32
3.3.1.	Preparación de medio de cultivo PDA.....	32
3.3.2.	Aislamiento y purificación del hongo <i>M. roleri</i> .....	32
3.3.3.	Preparación de extractos etanólicos.....	32
3.5.	Análisis estadístico.....	34
3.5.1.	Diseño completamente al azar (DCA).....	34
3.5.2.	Análisis de varianza (ANOVA).....	35
3.5.3.	Tukey.....	35
3.5.4.	Variable de estudio.....	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
5.	CONCLUSIÓN.....	39
6.	RECOMENDACIONES.....	39
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	40

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Taxonomía del cacao.....	18
<b>Cuadro 2.</b> Taxonomía de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	24
<b>Cuadro 3.</b> Prueba de homocedasticidad y normalidad.....	36
<b>Cuadro 4.</b> Análisis de la varianza.....	36
<b>Cuadro 5.</b> Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III).....	36
<b>Cuadro 6.</b> Análisis de varianza (ANOVA), de Diseño completamente al Azar (DCA).....	37
<b>Cuadro 7.</b> Prueba de comparación de medias Turkey (5%).....	37
<b>Cuadro 7.</b> Prueba de comparación de medias Turkey (5%).....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sintomatología de moniliasis.....	25
<b>Figura 2.</b> Ciclo de enfermedad moniliasis.....	26

## ÍNDICE DE TABLA

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos de extractos aplicados en el control micelial del hongo <i>M.roreri</i> .....	34
--	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Preparación de medio de cultivo (PDA).....	46
<b>Anexo 2.</b> Secado de plantas en estufa.....	46
<b>Anexo 3.</b> Aislamiento y purificación del hongo <i>M.roreri</i> .....	47
<b>Anexo 4.</b> Triturado y macerado de extractos botánicos.....	47
<b>Anexo 5.</b> Llenado de botellas 99ml PDA.....	48
<b>Anexo 6.</b> Plaqueo, extracción y aplicación de 1ml de extracto etanólico botánico para cada tratamiento.....	48
<b>Anexo 7.</b> Inoculación y siembra del hongo <i>M. roreri</i> en los diferentes tratamientos.....	49
<b>Anexo 8.</b> Crecimiento micelial luego de 15 días en los diferentes tratamientos.....	50

## 1. INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es una planta originaria de América, pertenece al género theobroma. Los mayas cultivaban el cacao y la pepa era utilizada como moneda, su consumo era reservado solo para los considerados de la alta sociedad, preparaban una bebida llamada “xocoatl” de donde se presume que tomo el nombre de chocolate (León, Calderón, & Mayorga, 2016).

Otra de las teorías sobre el origen del cacao se dio inicio en la selva de América del Sur, comprendida entre las cuencas de los ríos Caquetá, Putumayo y Napo denominada como el centro de origen del cacao, en el Amazonas el cacao se dispersó en dos rutas una hacia el norte (Centroamérica y sur de México) y otra hacia el oeste (Perú, Ecuador y Colombia) (De la Fuente de Diez Canseco, y otros, 2018).

A nivel mundial la producción de cacao anualmente es de 4.3 millones de toneladas de grano de cacao de los cuales están distribuidas 74.9% concentrado en África Occidental 12.1% en el sureste asiático y 13% en América latina, el país que produce el 35% de la producción mundial es Costa de Marfil (Solís , Zamarripa, Pecina, Garrido , & Hernández, 2015).

Los principales productores de cacao en América Latina son Brasil, Ecuador, Perú, Colombia, Venezuela, y Trinidad & Tobago, en el Ecuador el sector cacaotero creció en un 10% y las exportaciones alcanzaron 260 mil toneladas métricas (87% grano y 13% productos derivados). Los principales destinos de cacao ecuatoriano son América (54%), Europa (29%) y Asia (17%); a nivel mundial Ecuador es líder en producción del cacao de origen “Arriba” con el 61% del mercado mundial ( Moreno, Molina, Miranda, Moreno, & Moreno, 2020).

En el Ecuador la producción de cacao se localiza en 23 de las 24 provincias, Esmeraldas, Manabí, Pichincha y Cotopaxi ocupan 80.000 ha sembradas en la zona norte, la mayor concentración de plantaciones de cacao “Arriba” están comprendidas en la zona central que comprende la parte norte de la cuenca del Río Guayas y la provincia de Los Ríos, en la zona sur corresponde unas 80.000 ha establecidas en la provincia El Oro y el sur de la provincia de Guayas; en las provincias de Bolívar, Chimborazo, Cañar y Azuay existen unas 13.000ha y en la Amazonía unas 6.000ha, las principales provincias proveedoras de cacao “Nacional” de exportación son Orellana y Sucumbíos incrementando su densidad de siembra en unas 20.000 ha (Sánchez , Jaramillo , & Ramírez , 2015).

Ecuador tuvo su primer boom cacaotero desde el año 1860 hasta 1920, sin embargo, hubo problemas en las condiciones de productividad lo que dio paso al desarrollo de la enfermedad escoba de bruja, fue catalogada como la más dañina para el cultivo de cacao. Ecuador no estuvo preparado para el brote de la enfermedad lo que ocasiono en el año 1920 grandes pérdidas de plantaciones cacaoteras y el quebranto a su economía, perdiendo su posicionamiento en el mercado mundial (Quintana & Aguilar , 2018).

Las principales enfermedades en América laticas que atacan a las plantaciones de cacao son: la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) y la moniliasis (*Moniliophthora roreri*, en el Ecuador la escoba de bruja afecto un 60 a 70% de la producción, y la moniliasis provoco perdidas hasta de un 80% en plantaciones cacaoteras (Sanchez , y otros, 2015).

La moniliasis del cacao es una enfermedad causada por el hongo (*Moniliophthora roreri*), esta enfermedad se originó en el noreste de Colombia y en el Ecuador fue detectada por primera vez en el año 1917 ( Torres , Ortiz, Téliz, Mora, & Nava, 2013). Su sintomatología comienza con la invasión del patógeno intracelularmente llegando hasta las células del parénquima cortical, este es el periodo de incubación más largo de la enfermedad (Correa , Castro, & Coy, 2014). Las esporas del hongo atacan a los frutos dependiendo de la edad y condiciones ambientales provocando deformaciones, manchas color marrón cubiertas con un micelio blanco, marchitez y necrosis del fruto completamente (Lozada, Herrera, Perea, Stashenko, & Escobar, 2012).

Los principales controles para moniliasis que se ponen en práctica son el control cultural, químico y biológico, el manejo integrado asociado de los factores climáticos ha demostrado la reducción de la enfermedad en un 40%, otra de las alternativas es el uso de hongos antagonistas como el *Bacillus subtilis* para controlar los fitopatógenos en cultivos de importancia económica, además en el control químico se sugiere utilizar Clorotalonil, un fungicida no sistémico de amplio espectro. La aplicación de estos controles en conjunto ayuda a disminuir la diseminación de la moniliasis en plantaciones cacaoteras (Anzules , Borjas, Alvarado, Castro, & Julca, 2019).



Los extractos vegetales son una alternativa de agricultura sostenible, debido a su efectividad para el control de plagas, enfermedades y arvenses. Su principal característica es la presencia de metabolitos secundarios los cuales forman estrategias defensivas de las plantas agrupándose en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides. El uso de extractos botánicos tiene un bajo costo y no son contaminantes para el medio ambiente, se considera que existe alrededor de 3.000 compuestos naturales de origen vegetal que han demostrado actividad fungicida, bactericida, insecticida repelente y nematocida. (Celis, Mendoza, & Pachón, 2009).

La manzanilla es una planta herbácea medicinal, pertenece a la familia Asteraceae, es originaria de Europa y Asia occidental ( Moreira, Armijos , Cabrera , & Cueva , 2019). Los biopolímeros presentes en el extracto de manzanilla estimulan a la fisiología vegetal y división celular, aumentando la resistencia a condiciones climatológicas y al ataque de plagas y enfermedades. Asegurando un rendimiento del metabolito de las plantas desplazándose hacia el sitio de la infección (Cuamacas, 2013). La manzanilla contiene sus principios activos en la flor, como ácido etéreo, ácido isobutírico, ácido metilcrotónico, azuleno, antosterol y antosterina (Chalacamá , 2016).

Una vez analizado el efecto de las enfermedades en el cultivo de cacao, y las pocas alternativas para el manejo y el control de moniliasis, se propone el uso de extractos botánicos como una alternativa cultural contra hongos fitopatógenos, por lo que se empleara diferentes tratamientos de extractos etanólicos para inhibir el crecimiento micelial del hongo (*Moniliophthora roreri*), a nivel in vitro.

### **Objetivo general**

- Determinar el mejor extracto etanólico que inhiba el crecimiento micelial del hongo *M. roreri* a nivel in vitro.

### **Objetivo específico**

- Medir el crecimiento radial del hongo fitopatógenos, en los diferentes tratamientos a través del tiempo.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Origen

A nivel mundial se mantiene una teoría sobre el origen de la domesticación del cacao, sosteniendo que se situaba geográficamente en Mesoamérica entre los países de México, Guatemala y Honduras, donde se encontraron rastros de uso aproximadamente 2,000 años antes de Cristo. En la actualidad varios estudios expusieron resultados donde se demuestra que en la Amazonia existe una o más variedades de *Theobroma cacao* L que han sido utilizadas en la región durante los últimos 5,000 años ( Lanaud, Llor, Zarrillo, & Valdez , 2012).

El cacao es un árbol que se desarrolla en zonas tropicales con humedad alta, generando su crecimiento en distintos lugares en el mundo. América central abarca una diversidad de plantaciones del género *Theobroma*, pertenece a la familia *Malvaceae*, se encontraron numerosas especies 19 están situadas en América del Sur y 13 en la cuenca del Orinoco-Amazonas ( Pérez, y otros, 2021)

### 2.2. Taxonomía

Según Arvelo, Maroto , Delgado , Montoya , & González (2017), la taxonomía del cacao se clasifica en:

**Cuadro 1. Taxonomía del cacao**

<b>Reino</b>	Vegetal
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Dilleniidae
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Esterculiaceae
<b>Subfamilia</b>	Byttnerioideae
<b>Tribu</b>	Theobromeae
<b>Genero</b>	Theobroma
<b>Especie</b>	Theobroma cacao l.

### **2.3. Descripción botánica**

Theobroma, pertenece a la familia malvácea y subfamilia sterculioidae son arboles ramificados con hojas simples y un fruto carnoso(mazorca). Este género se desarrolla en lugares tropicales húmedos su mayor diversidad está distribuida desde la cuenca del Amazonas hasta la región Mesoamericana, son cultivados para el mercado interno y mundial por la gran demanda que genera para la elaboración de chocolate. (Arvelo, Maroto , Delgado , Montoya , & González, 2017)

#### **2.3.1. Tallo**

Las plantas de cacao, reproducidas por semillas, desarrollan un tallo principal de crecimiento vertical que puede alcanzar 1 a 2 metros de altura a la edad de 12 a 18 meses. A partir de ese momento la yema apical detiene su crecimiento y del mismo nivel emergen de 3 a 5 ramas laterales. A este conjunto de ramas se le llama comúnmente verticilio u horqueta (Estrada, Romero, & Moreno, 2011)

#### **2.3.2. Hojas**

Tienen un color verde oscuro en el haz y otro más pálido en el envés ( Montes Mosquera, 2016).Sus hojas son simples coriáceas, ovadas, ligeramente asimétricas y alternas pubescentes en ambas caras, el largo de la hoja aproximadamente va desde 17 a 48 cm con un ancho de 8 a 10 cm, la base es redondeada con un ápice apiculado (Arvelo, Maroto , Delgado , Montoya , & González, 2017).

#### **2.3.3. Flores**

Las flores son pentámeras, hermafroditas, actinomorfas, y de 10 a 20 mm de diámetro, con un pedúnculo floral de 1 a 3 cm de largo. Los sépalos son blancos o rosa claros, de 5 a 8 mm de largo y de 1.5 a 2 mm de ancho, angostamente lanceoladas, persistentes y fusionados en la base (Arvelo, Maroto , Delgado , Montoya , & González, 2017).

#### **2.3.4. Fruto**

El fruto es una baya grande (mazorca), polimorfa, esférico a fusiforme, púrpura o amarillo en la madurez, glabro, con medidas de 10, 20 o 35 cm de largo y 7 cm ancho, con 200 a 1000 gr de peso y con 5 a 10 surcos longitudinales. El endocarpo es de 4 a 8 mm de grosor, duro, carnoso, y leñoso (Arvelo, Maroto , Delgado , Montoya , & González, 2017).

### **2.3.5. Semillas**

Las semillas son café-rojizas, ovadas, ligeramente comprimidas. Con medidas de 20, 30 y hasta 50 mm de largo, 12 a 16 mm de ancho y 7 a 12 mm de grosor (Arvelo, Maroto , Delgado , Montoya , & González, 2017).

## **2.4. Producción**

### **2.4.1. Producción mundial**

En el mundo se exportan 3,3 millones de toneladas de cacao ,África es el principal productor con el 66%, los países de Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún son los más representativos en producción a nivel mundial, seguido de Asia con un 17,5% y américa que en la última década llegó a un incremento del 11% siendo Ecuador y Brasil sus principales productores ( Sánchez, Zambrano, & Iglesias, 2019).

A nivel mundial el cacao es comercializado de diferentes maneras en grano seco, torta, pasta, manteca polvo y chocolate. Los países con más demanda de consumo son Estados Unidos (20%), Alemania (9%), Francia (6%), Reino Unido (6%), Brasil (5%), Rusia (5%) y Japón (4%) (Gamboa , Rodríguez , Gamboa, Duran, & Rojas, 2021).

### **2.4.2. Producción nacional**

En el Ecuador las plantaciones de cacao están distribuidas geográficamente en 16 provincias, que ocupa una superficie de 500 mil hectáreas. Las provincias con mayor producción son Los Ríos, Guayas, Manabí, Esmeralda y El Oro. ( Pérez , Chimborazo , & Freile, 2015)

En el Ecuador se considera que el 95% de su producción la lideran los pequeños productores, que tienen una superficie de siembra menor a 3 hectáreas, sin embargo el cacao ecuatoriano está posicionado a nivel mundial , pero presenta muchos problemas internos al momento de la comercialización y exportación debido a muchos factores socioeconómicos (Barrezueta, Prado, & Jimbo, 2017).

## **2.5. Tipos de cacao**

Después de realizar estudios, los botánicos del siglo pasado, determinaron que el cacao Criollo era originario de Mesoamérica, y el Forastero de la Amazonia. Entre el cruzamiento de estos dos tipos surge el cacao Trinitario, se le asignó el nombre por la isla Trinidad. Estos grupos tienen diferentes características morfológicas y calidad en la elaboración del chocolate ( Durán & Dubón, 2016).

### **2.5.1. Criollo o nativo**

Este tipo de cacao es reconocido por su calidad y fino aroma para la elaboración de chocolate, su mazorca es rugosa y surcos pronunciados, son de color verde y se tornan de color rojo a la madurez, tiene un sabor astringente debido a la poca presencia de taninos que le aporta un sabor seco, áspero y rugoso. El mucilago tiene una textura suave y dulce luego de ser fermentado tiene un aroma muy agradable, el cacao criollo fue desapareciendo a lo largo de Mesoamérica por la reducción de la población indígena y la llegada del cacao tipo forastero. En la actualidad se pueden encontrar ciertos arboles de cacao criollo de manera silvestre debido a la baja adaptabilidad para desarrollarse en diferentes condiciones ambientales y poco material genético existente. ( Durán & Dubón, 2016)

### **2.5.2. Forastero**

El cacao de tipo forastero es de menor calidad y aroma , tales como los chocolates que elaboran con sus granos , la superficie de la mazorca es lisa ,de forma ovalada y surcos ligeramente visibles se tornan de color verde pálido ,sus cotiledones son de color morado, y su sabor es amargo .El mucilago es acido y difícil de emanar algún aroma luego del fermentado ,originario del alto y bajo Amazonas .El cacao forastero es muy productivo pero tiene susceptibilidad a plagas como la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*) y a la moniliasis (*Moniliophthora roreri*). Para elaborar chocolate con este cacao se necesita un proceso de fermentado y secado por mucho más tiempo. Lo que origina un poco más de trabajo en los productores y se ha ido desapareciendo la iniciativa en utilizarlos ( Durán & Dubón, 2016).

El 80% de la producción mundial de semillas de cacao son variedades del grupo Forastero debido a su alta capacidad de producción y cierta tolerancia a las enfermedades (Valle & De Almeida, 2007).

### **2.5.3. Trinitario**

El cacao Trinitario se originó por el Cruce de dos tipos el Criollo que es fino en su aroma y calidad y el Forastero que tiene una alta producción, susceptibilidad a plagas y baja calidad, el nuevo material genético que surgió contiene las características de ambos, y lo hacen al cacao trinitario la primera opción de los productores para el desarrollo de plantaciones cacaoteras ( Durán & Dubón, 2016).

## **2.6. Principales enfermedades que afectan al cultivo de cacao**

A nivel mundial existen diferentes factores que son los causantes de la baja producción en el cultivo de cacao, las enfermedades que causan más daño son escoba de bruja que es causada por el hongo *Moniliophthora perniciosa* Stahel, la moniliasis provocada por *Moniliophthora roreri* y la mazorca negra (*Phytophthora* spp.) ( Martínez de la Parte & Pérez , 2015).

No se ha encontrado un control eficaz y económicamente rentable para estas enfermedades, se ha demostrado que el mejoramiento genético tiene buenos resultados en plantaciones cacaoteras enfermas ( Hernández, y otros, 2015).

El incremento de estas enfermedades es debido a los cambios ambientales, tecnológicos, económico y sociales, no dejando otra alternativa a los productores que optar por otros cultivos ( Hernández, y otros, 2015).

### **2.6.1. Escoba de bruja**

A nivel mundial la escoba de bruja está considerada como la segunda enfermedad que provoca pérdidas en la producción de un 30% a 90%. Su agente causal es el hongo *Moniliophthora perniciosa* que ataca a los tejidos ocasionando pérdidas de producción y debilidad a la planta. Su sintomatología aparece con clorosis en las hojas, presentan necrosis en las yemas, deformaciones del fruto y lesiones necróticas, las semillas presentan hidrolisis de cotiledones ocasionando la deformación de las almendras. El control más efectivo para esta enfermedad es el manejo integrado que establece la aplicación de diferentes tipos de podas, eliminar arboles afectados, remoción y quema de mazorcas enfermas y el uso de material genético que presente resistencia a la enfermedad (Sánchez , Jaramillo , & Ramírez , 2015).

### **2.6.2. Mazorca negra**

EL género *Phytophthora* tiene muchas especies que provocan la enfermedad “mazorca negra” en cacao, *P.palmivora* es la causante de daños que van desde un 30% hasta un 60% en plantaciones cacaoteras (Anzules , Borjas, Alvarado, Castro, & Julca, 2019).El síntoma más característico de la mazorca negra es provocar lesiones de color marrón en todo el fruto, el patógeno ataca al tejido interno ocasionando la pudrición de las almendras, dejando una decoloración negra y momificada, la mayoría de las mazorcas enfermas presentan sus lesiones en el punto de inserción del pedicelo (Sánchez , Jaramillo , & Ramírez , 2015).Para

el control de esta enfermedad recomiendan la utilización de fungicidas químicos a base de cobre, complementado con la remoción de mazorcas enfermas y una precipitación adecuada (Anzules , Borjas, Alvarado, Castro, & Julca, 2019).

### **2.6.3. Monilia**

El origen de la enfermedad se da en América del Sur, siendo Ecuador y Colombia los primeros países en presentar su sintomatología y afecciones en las plantaciones (Sánchez , Jaramillo , & Ramírez , 2015).

En Latinoamérica, los productores de cacao han venido decreciendo en su producción los últimos 10 años, debido a la enfermedad monilia (*Moniliophthora roreri*) por su fácil adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Pabón, Herrera, & Sepúlveda, 2016).

El manejo integrado para moniliasis, ha demostrado una reducción del 40% de esta enfermedad en plantaciones de cacao, luego de haber realizados labores culturales como podas, raleos y la incorporación de microorganismos antagonista para el control de fitopatógenos (Anzules , Borjas, Alvarado, Castro, & Julca, 2019).

### **2.7. Moniliophthora roreri**

La moniliasis es una enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri* en el cacao, afecta a los frutos provocando pérdidas en la producción más de un 30%. Se ha puesto en práctica alternativas de control con productos de baja toxicidad y un buen manejo integrado para reducir la diseminación del hongo en las plantaciones (Huaman & Cabezas , 2019). La causa del abandono del 50% de plantaciones de cacao en distintas regiones fue la moniliasis (Pérez V. , 2018).

### 2.7.1. Taxonomía

Según ( Suárez & Hernández, 2010), la taxonomía de *Moniliophthora roreri* se clasifica en:

**Cuadro 2. Taxonomía de *Moniliophthora roreri***

<b>Dominio</b>	Eukaryota
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filum</b>	Basidiomycota
<b>Clase</b>	Basidiomycetes
<b>Subclase</b>	Agaricomycetidae
<b>Orden</b>	Agaricales
<b>Familia</b>	Tricholomataceae
<b>Género</b>	<i>Moniliophthora</i>
<b>Especie</b>	<i>M. roreri</i>

### 2.7.2. Agente causal

El hongo que provoca la enfermedad de la monilia inicialmente se lo llamo *Monilia roreri*, y se lo clasifico dentro del filum Ascomicota por sus estructuras similares con otros fitopatogenos. Luego de varios estudios de microscopia electrónica se determinó la creación del nuevo género que so lo conoce en la actualidad como “*Moniliophthora*”( Suárez & Hernández, 2010).

*Moniliophthora roreri* se presenta en dos fases infecciosas, la fase biotróficos que provoca las malformaciones en el fruto, y la necrótica que ocasiona la pudrición y muerte de la fruta. La espora del hongo tiene diferentes mecanismos de diseminación que son el viento, agua, animales y personas ( Mollocana, Erazo, Aguirre, & Torres, 2019)

### 2.7.3. Sintomatología

Las apariciones de los síntomas pueden variar con la edad del fruto y el tipo de cacao en la plantación al momento de la diseminación del patógeno (Suarez & Delgado, 1993).

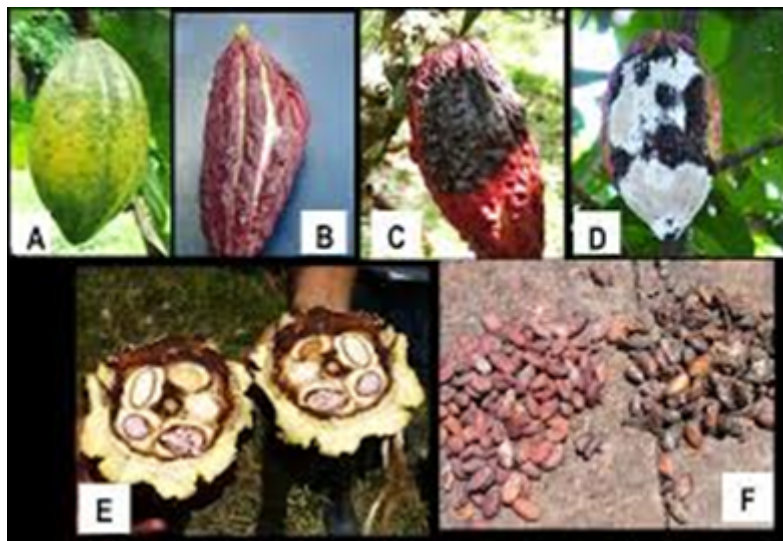
A los frutos de dos meses se les presenta abultamientos en la superficie de la mazorca, una mancha café se va extendiendo empezando a aparecer una capa blanca que corresponde al micelio del hongo y luego de tres a siete días emerge las esporas de color crema, un síntoma



adicional es la madurez prematura, estos frutos son susceptibles hasta las 10 semana de edad (Sánchez & Garcés, 2012).

Los síntomas que se presentan por lo general son la de decoloraciones acuosas, la deformación de los tejidos de los frutos (tumefacción), el desarrollo de manchas irregulares pardas (necrosis) en los tejidos afectados, la maduración precoz de las mazorcas, la aparición masas blancas de esporas, la momificación de los frutos y la producción dentro del fruto y las semillas de cacao (Pérez V. , 2018).En las plantaciones la *M. roleri* infecta de forma directa y los síntomas que primero aparecen son la coloración marrón en la mazorca y manchas necróticas aceitosas. (QUEVEDO, 2016).

**Figura 1. Sintomatología de moniliasis**



Fuente: (Pérez V. , 2018).

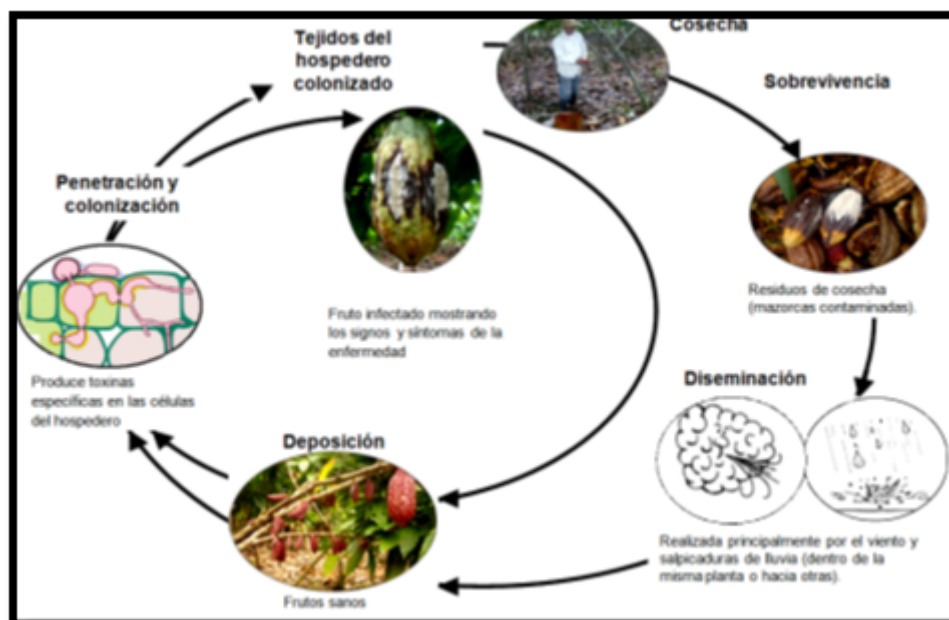
#### **2.7.4. Ciclo de la enfermedad**

El ciclo de la enfermedad comienza en la época seca, donde se encuentra disponible la mayor cantidad de esporas, la humedad debe de estar presente en la proliferación del hongo para garantizar la infección, las esporas son diseminadas por el viento, la lluvia o por las personas, lo cual infectan las mazorcas de cacao no maduras causando una hinchazón y maduración prematura (Pérez V. , 2018).

Las esporas germinan y entran a través de la epidermis de la vaina o por las estomas colonizando los tejidos. En el campo los tejidos jóvenes son los más susceptibles a la infección (Bailey & Meinhardt, 2016).

Los conidios germinan con la presencia de agua y a los 24°C, en los laboratorios la inoculación de las esporas del hongo *M. roleri* tiene una viabilidad de 22 meses, las esporas tienen una germinación de 6 y 8 horas, la hifa penetra la epidermis del fruto y se propaga en los tejidos subepidermales y el exocarpo, La infección se desarrolla rápidamente por tejidos centrales y semillas provocando necrosis en la parte interna y externamente ocasiona puntos aceitosos convirtiéndose en manchas de color marrón o amarillo, el proceso infeccioso que demora el micelio en provocar lesiones blancas generando un color marrón en su desarrollo es de 3 y 4 días. El ciclo de vida aproximadamente del hongo *M. roleri* dura 60 días en cultivares de cacao susceptibles y 73 días en clones resistente a la moniliasis (Suárez & Hernández, 2010).

**Figura 2. Ciclo de enfermedad moniliasis**



Fuente (Sánchez & Garcés, 2012).

## 2.7.5. Tipos de controles

### 2.7.5.1. Químico

Varios investigadores han propuesto el control químico para el manejo de la moniliasis, pero tiene un alto costo para su aplicación, los productos más recomendados y con mejores resultados de aplicación los fungicidas sistémicos (azoxystrobin, trifloxystrobin, tebuconazole y propiconazole), protectantes (sulfato de cobre, hidróxido de cobre, óxido cuproso, oxiclورو de cobre y polisulfuro de calcio), han demostrado la eficiencia y la reducción contra el patógeno (Anzules, Borjas, Alvarado, Castro, & Julca, 2019).

### **2.7.5.2. Biológico**

Uno de los controles con mejores resultados es el manejo integrado de plagas (MIP), es una práctica eficiente para el control de plagas y enfermedades. El control biológico o biocontrol se basa en el empleo de organismos vivos o virus que disminuyan la incidencia de insectos plagas o patógenos dentro de las plantaciones. El empleo de este control favorece a la conservación de los enemigos naturales, desarrollando agroecosistemas que permita su fácil adaptabilidad y el empleo de mecanismos de acción, los biocontroladores tienen la función de disminuir la incidencia de la enfermedad ( Suárez & Hernández, 2010).

La aplicación de endófitos en el control biológico de enfermedades ayuda a producir metabolitos secundarios, generando resistencia contra enfermedades causadas por bacterias, nematodos y hongos patógenos. El empleo de *T. stromaticum*, ha tenido resultados favorables en el control del hongo *M. perniciosus* que ocasiona la enfermedad escoba de bruja en el cacao ( Aragón & Beltrán, 2018).

### **2.7.5.3. Cultural**

El control cultural es la principal herramienta para el manejo de enfermedades en cacao, esta práctica consiste en una serie de labores dentro de la plantación como podas fitosanitarias, remoción y desecho de mazorcas, manejo de sombra y descope de los árboles, estos labores pueden llegar a reducir la incidencia de las enfermedades en el cacao hasta en un 50%, sin embargo realizar estas prácticas tienen un costo elevado de mano de obra y dificultad al momento de realizar las podas en árboles que superan los tres metros y la falta de implementación de estas medidas en plantaciones vecinas ( Guerrero, Cevallos, Eguez, & Peñaherrera, 2020).

Una práctica cultural que se realiza en plantaciones de cacao tradicionalmente es la remoción de mazorcas enfermas para el control de moniliasis. Se recomienda la eliminación de mazorcas afectadas semanalmente, mejorando la producción y reduciendo la diseminación del hongo *M. roleri* ( Kraus, y otros, 2003).

## **2.8. Efecto de Extractos vegetales en control fúngico de enfermedades.**

Existen diferentes alternativas de control para el manejo de enfermedades en cacao, pero no se han tenido resultados alentadores, por lo tanto, se ha propuesto nuevas ideas para disminuir la propagación de los hongos causantes de las enfermedades en plantaciones de cacao, aplicando medidas que tenga un bajo impacto ambiental como es el uso de extractos

vegetales. Los extractos botánicos se caracterizan por la presencia de metabolitos secundarios que son los encargados de generar estrategias de defensa en las plantas ( Arcos, Martínez, Ortiz, Martínez, & Avendaño, 2019).

Los metabolitos secundarios son un conjunto de reacciones químicas, compuesto de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos presentes en la planta, no tienen una función definida, pero actúan de manera ecológica, protectora y como pesticidas naturales ( Ávalos & Pérez, 2009).

Estos compuestos son utilizados por las plantas como defensa en condiciones de estrés biótico y abiótico. Las enzimas de la planta son las encargadas de sintetizar y degradar la pared celular de los microorganismos tóxicos. Se agrupan en flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides, lectinas y polipéptidos ( Andrade, y otros, 2017).

Muchas especies vegetales tienen control sobre la actividad fúngica, en diferentes tipos de extractos etanólicos, metanólicos, acuosos y aceites esenciales (Mesa, Marin, Ocampo , Calle, & Monsalve , 2019).

### **2.8.1. Llantén (*Plantago major*)**

El llantén (*Plantago major*) es una planta que se puede encontrar con facilidad, por su fácil adaptabilidad a cualquier medio, esta planta posee propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y cicatrizantes. El llantén está compuesto de un metabolito secundario llamado aucubigenina se cree que es el encargado de la actividad antibacteriana de la planta (Ramírez, Britos, Torres, & Karaben, 2018).

El extracto etanólico de llantén inhibe el crecimiento de los hongos *C. musae* y *B. cinérea*, desarrollan metabolitos secundarios como los flavonoides que se encuentra en soluciones fenólicas, donde presentan actividad fungicida (López, Vélez, Sánchez , Bonilla , & Gallo, 2006).

### **2.8.2. Ajo (*Allium sativum*)**

El ajo (*Allium sativum*) es un bulbo perteneciente a la familia Amaryllidaceae. Los extractos acuosos de ajo pueden inhibir el crecimiento de diferentes hongos, se conocen más de 100 compuestos derivados de *Allium sativum* que contienen una sustancia llamada aliina a la que se le atribuye efectos antimicrobianos y antimicóticos. Los extractos acuosos de ajo controlan

un 95% de actividad fungicida contra el hongo *Fusarium oxysporum* causando la inhibición de síntesis de lípidos, ácidos nucleicos y proteínas (Juárez, y otros, 2019).

Varios autores han señalado que el extracto de ajo contiene un efecto inhibidor en hongos como: *Rhizoctonia solani*, *Alternaria spp* y *Curvularia spp* en diferentes concentraciones del extracto (Alcalá de Marcano, Vargas, & Pire, 2005).

La alicina disminuye su efecto fúngico conforme va en aumento la temperatura, el extracto hidroalcohólico de ajo emite volátiles capaces de conferir protección a los racimos de uvas contra la pudrición gris causada por *B. cinerea* durante 14 días evaluados a 4 y 25 °C (Campa, y otros, 2017).

### **2.8.3. Ruda (*Ruta graveolens*)**

La ruda (*Ruta graveolens*) es una planta herbácea, contiene propiedades espasmolíticas, venotónicas, antihistamínicas, antihelmínticas y antiparasitarias. La aplicación del extracto de ruda ha presentado efectos insecticidas y antimicrobiano ( Alegre, Bonifaz, Solange Lee, & Iannacone, 2017).

Los metabolitos secundarios presente en los extractos etanólico de ruda son Esteroides y triterpenoides y los Flavonoides (López, Vélez, Sánchez , Bonilla , & Gallo, 2006). Según ( Bañuelos, Delgadillo, Echavarría, Delgadillo, & Meza, 2018), demostraron que los extractos que estudiaron contienen terpeno y compuestos fenólicos. En los extractos de ruda se identificó a los compuestos de limoneno, timol y carvacrol.

El extracto de ruda (*R. graveolens*) inhibe el crecimiento micelial de *Trichoderma* desde un 53% hasta un 81% en sus diferentes cepas ( Arcos, Martínez, Ortiz, Martínez, & Avendaño, 2019).

### **2.8.4. Manzanilla (*Chamaemelum nobile*)**

La manzanilla (*Chamaemelum nobile*) es una planta de la familia Asteraceae, el extracto de manzanilla tiene diferentes usos espasmolíticos, ansiolítico y antibacteriano (Meneses, Soto, Espinosa, & Ramírez, 2008).

La manzanilla posee estrategias químicas de defensa que provocan repelencia o efectos de disuasión. Las fitoalexínases presentes activan las defensas lo cual generan resistencia al ataque de patógenos (Chalacamá , 2016).

Según García y otros (2009), demostraron que la manzanilla de castilla (*M. recutita*) se encuentran diferentes componentes como flavonoides, aminoácidos, aminos, azúcares y oligosacáridos.

El extracto de manzanilla a nivel *in vitro* presenta una inhibición micelial contra el hongo *C. acutatum* causante de la enfermedad Antracnosis, debido a sus compuestos fenólicos y alcaloides presentes en sus metabolitos (Villacís, y otros, 2017).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación**

El estudio se realizó en el laboratorio de fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias perteneciente a la Universidad Técnica de Machala, ubicada en la Av. Panamericana, 5,5 km vía Machala-Pasaje, parroquia El Cambio en el cantón Machala, provincia de El Oro.

#### **3.2. Materiales y equipos**

##### **3.2.1. Equipos de laboratorio**

- Microondas
- Estufa
- Cámara de flujo
- Microscopio
- Auto Clave
- Licuadora
- Balanza

##### **3.2.2. Materiales de laboratorio**

- Algodón
- Vasos de precipitación
- Pipeta
- Jeringa 1cc
- Botellas de vidrio
- Cajas Petri
- Mechero de alcohol
- PDA (PAPA- DESTROZA-AGAR)
- Cinta plástica
- Fundas de papel
- Cloranfenicol
- Alcohol
- Pinzas
- Recipientes plásticos

### ■ 3.2.3. Material vegetativo

- Manzanilla (*Chamaemelum nobile*)
- Ajo (*Allium sativum*)
- Ruda (*Ruta graveolens*)
- Llantén (*Plantago major*)

## 3.3. Metodología

### 3.3.1. Preparación de medio de cultivo PDA

Se preparó 600ml de medio de cultivo papa-destroza-agar (PDA), se pesó en una balanza digital 24gr de PDA, que fueron colocados en un vaso de precipitación de 600 ml y se adiciono 300 ml de agua purificada, se agito y se llevó al microondas durante 3 minutos hasta ver una pequeña ebullición y notar una apariencia traslúcida, se adiciona al medio 60 mg de antibiótico (clorofenicol) , una vez listo se afora con agua caliente a 600ml el medio , luego con la ayuda de una probeta se midió 99ml de PDA que fueron distribuidas en 6 botellas de vidrio y selladas con una con una hoja de aluminio y cinta alrededor para ser llevadas al autoclave durante 20 minutos para su esterilización, una vez terminada la esterilización se procede a llevar las botellas de vidrio a la cámara de flujo , para realizar el plaqueo correspondiente en cajas Petri de plástico de acuerdo a los tratamientos a realizarse.

### 3.3.2. Aislamiento y purificación del hongo *M. roleri*

Para realizar el aislamiento y purificación del hongo, nos dirigimos al jardín clonal de cacao perteneciente a la Universidad Técnica de Machala (UTMACH), del cual se extrajo mazorcas variedad CCN-51 que presentaban la sintomatología de la enfermedad moniliasis causada por el hongo *M. roleri*, se las retiro de árbol de cacao y se las coloco dentro de una funda para evitar la diseminación de las esporas dentro de la plantación, las mazorcas enfermas fueron trasladadas al laboratorio para sacar las respectivas muestras del hongo ,se colocó dentro de una caja Petri con pda , un micelio del hongo extraído de las mazorcas para el desarrollo de las colonias durante 14 días, la purificación se realizó con las mejores muestras que evidenciaron un crecimiento radial homogéneo y puro, durante 14 días más desarrollándose normalmente en una temperatura ambiente(25°C).

### 3.3.3. Preparación de extractos etanólicos

Las plantas que se utilizaron para el estudio son: Llantén (*Plantago major*), Ajo (*Allium sativum*), Ruda (*Ruta graveolens*) y Manzanilla (*Chamaemelum nobile*), debido a que varias



literaturas han demostrado la presencia de metabolitos secundarios capaces de reducir el incremento de fitopatógenos. Se recolectaron las plantas en el mercado central de Machala.

Todas las plantas fueron llevadas al laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala, para realizar los siguientes procesos descritos a continuación.

#### **3.3.3.1. Secado**

Para esta práctica se procedió a depositar el material vegetativo en fundas de papel selladas y descrita con su respectivo nombre en la estufa a excepción del ajo. Se dejó las plantas secar a 60°C durante 48 horas.

Luego de haber terminado con el secado, se retira las plantas y se procede a pulverizar con la ayuda de una licuadora hasta obtener 40 gr de extracto en polvo, esta práctica se realizó con las tres plantas, a diferencia del ajo (bulbos) que fue triturado con un mortero con pistilo para luego ser depositados en un recipiente.

#### **3.3.3.2. Macerado**

Una vez terminado con el secado y la pulverización de los extractos en seco, se colocaron en diferentes recipientes de plástico con capacidad de un litro, 40 gr de extracto seco + 80ml de alcohol al 96% pureza, logrando una relación 1:2 (P/V). Luego de haber realizado esta práctica con los 4 extractos se lo deja macerar en un lugar fresco y sellado durante 48 horas.

#### **3.3.4. Siembra del inóculo**

Luego de realizar la esterilización de las botellas de vidrio con un volumen conocido de 99 ml de PDA, se procede a llevar a la cámara de flujo donde se plaqueará en cajas Petri y adicionalmente se colocará 1 ml de extracto etanólico de las diferentes plantas a evaluar.

Se realiza el plaqueo de los diferentes tratamientos, adicionando a cada botella de vidrio con 99 ml de PDA, con una jeringa se extrae 1 ml de extracto etanólico de llantén, manzanilla, ruda y ajo, los testigos se realizarán con alcohol y sin alcohol con la misma dosis. Una vez terminado el plaqueo y la solidificación del PDA + Extracto se prepara los tratamientos para inocular el hongo *M.roreri*.

Para la inoculación preparamos las herramientas pinzas, saca bocado, mechero del alcohol, plástico y el hongo aislado y purificado días anteriores.

Se calienta el sacabocado , con la ayuda del mechero de alcohol por 30 segundos, luego se deja enfriar unos segundos y se procede a extraer el micelio del hongo *M. royeri* y con la ayuda de una pinza se retira y se coloca en las cajas Petri que están listas con los diferentes extractos etanolicos de las plantas y se coloca boja abajo el micelio y se tapa , para evitar contaminación y otros agentes que puedan causar interferencia en el crecimiento micelial , se cubre alrededor de la circunferencia de la caja Petri con un plástico para mantener su pureza y se señala cada tratamiento con un marcador para su identificación y toma de datos crecimiento o la inhibición del hongo. Para finalizar se pone los tratamientos en fundas plásticas y se evaluara durante 15 días.

### 3.4. Tratamiento de extractos

**Tabla 1. Tratamientos de extractos aplicados en el control micelial del hongo *M. royeri*.**

Tratamiento	Plantas	Dosis
T1	Sin alcohol(testigo absoluto)	0CC
T2	Alcohol	1CC
T3	Ruda	1CC
T4	Llantén	1CC
T5	Ajo	1CC
T6	Manzanilla	1CC

### 3.5. Análisis estadístico

#### 3.5.1. Diseño completamente al azar (DCA)

El Diseño completamente al azar (DCA) es un diseño simple que estudia el efecto de un factor el cual se divide en diferentes tratamientos. En esta investigación se va a evaluar el crecimiento micelial del hongo *M. royeri* , para determinar cuál es el mejor extracto botánico con mayor inhibición sobre el crecimiento radial del hongo a nivel in vitro.

$$Y_{kn} = \mu + T_k + \epsilon_{kn}$$

- $Y_{kn}$ =variable de respuesta
- $\mu$ = media global T
- $k$ = efecto del tratamiento
- $\epsilon_{kn}$ = error aleatorio

### **3.5.2. Análisis de varianza (ANOVA)**

Consiste en analizar los cocientes de las varianzas para probar la hipótesis de igualdad o desigualdad entre las medias debidas a los tratamientos. Para lo cual se separa la variación total en las partes con que contribuye cada fuente de variación. En el caso de DCA las fuentes de variación principales son las debidas a los tratamientos y las debidas al error.

### **3.5.3. Tukey**

La prueba de Tukey es similar a una prueba t de Estudiante en cuanto a que se calcula una única diferencia crítica para realizar todas las comparaciones entre las medias; sin embargo, es también similar a la prueba de Duncan y de Newman-Keuls en cuanto a que el valor de esta diferencia crítica depende del número de comparaciones que se haga. (Fallas, 2012)

### **3.5.4. Variable de estudio**

La variable de estudio a evaluar fue el crecimiento micelial del hongo *M. roreri*, en base a la aplicación de diferentes tratamientos de extractos botánicos.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Cuadro 3. Prueba de homocedasticidad y normalidad

##### Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (una cola)
RDUO_CRECIMIENTO MIC	24	-3.6E-17	0.18	0.95	0.4827

##### PRUEBA DE LEVENE (Anova con residuos absolutos)

##### Cuadro 4. Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS_CRECIMIENTO MIC	24	0.36	0.18	87.93

##### Cuadro 5. Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	Valor p
Modelo	0.12	5	0.02	1.99	0.1296
TRATAMIENTOS	0.12	5	0.02	1.99	0.1296
Error	0.23	18	0.01		
Total	0.35	23			

Se realizó la prueba de **Shapiro-Wilk** ‘normalidad’ y **Levene** ‘homocedasticidad’ los cuales indicaron que los datos se ajustan a una distribución normal.

**Cuadro 6. Análisis de varianza (ANOVA), de Diseño completamente al Azar (DCA)**

```
Nueva: 5/3/2021 - 13:35:48

Análisis de la varianza

Variable      N  R²  R²Aj  CV
-----
CRECIMIENTO MICELIAL 24 0.93 0.91 7.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC Tipo III)
F.V.      SC  gl  CM  F  Valor p
-----
Modelo    10.23  5  2.05  49.75 <0.0001
TRATAMIENTOS 10.23  5  2.05  49.75 <0.0001
Error      0.74  18  0.04
Total     10.97  23
```

De acuerdo al cuadro 6, en el ANOVA se observa el p valor tiene un valor de significancia de <0.0001 entre los tratamientos, lo cual indica que se acepta la hipótesis alternativa (<0,05), es decir al menos un tratamiento es diferente estadísticamente al resto de los tratamientos.

**Cuadro 7. Prueba de comparación de medias Turkey (5%)**

```
Test : Tukey Alfa: 0.05 DMS: 0.45583
Error: 0.0411 gl: 18
TRATAMIENTOS Medias n
-----
T6      1.76  4  A
T3      2.53  4  B
T5      2.63  4  B
T4      3.41  4  C
T1      3.51  4  C
T2      3.54  4  C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<=0.05)
```

En el Cuadro 7, en la prueba de Tukey 5%, de los promedios de crecimiento micelial (mm) se observan 3 niveles de agrupamientos entre los tratamientos estudiados. Dicha prueba indica que el tratamiento T6 (Extracto etanólico Manzanilla) es estadísticamente superior al resto de los tratamientos. Estos datos obtenidos son similares a los reportados por (Villacís, y otros, 2017) los cuales nos indican que el extracto de manzanilla inhibió el crecimiento micelial del hongo (*Colletotrichum acutatum*) causante de la enfermedad Antracnosis en un 52.78 % . Le sigue en orden de eficacia el T3(Extracto etanólico Ruda), según ( Arcos, Martínez, Ortiz, Martínez, & Avendaño, 2019) evidenciaron que el extracto de ruda inhibió el crecimiento micelial *M. royeri* en un 57%.El T5(Extracto etanólico ajo), es estadísticamente similar al

T3(Extracto etanólico Ruda), en otro trabajo realizado por (Juárez, y otros, 2019) demuestra que el extracto acuoso de (*Allium sativum*) a concentración de 9 y 10 g/ml inhibió el desarrollo de *Fusarium culmorum*, *Penicillium* sp. y *Aspergillus candidus*.

Por último, los tratamientos T4(Extracto etanólico llantén) y T2(testigo con alcohol 1%) son estadísticamente iguales al T1(testigo), es decir no tuvieron un efecto sobre el crecimiento micelial del hongo (*Moniliophthora roreri*).

## **5. CONCLUSIÓN**

En condiciones controladas de laboratorio, el tratamiento 6 (extracto etanólico de manzanilla al 1%) fue el que presentó mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial y es estadísticamente diferente al resto. Le sigue en orden de eficacia el T3(Extracto etanólico de Ruda al 1%) y T5(Extracto etanólico de ajo al 1%), ambos son estadísticamente iguales.

El tratamiento T4(Extracto etanólico llantén) no presentó actividad antifúngica sobre *M. roleri* por lo que es estadísticamente igual al T1(testigo absoluto).

El tratamiento 1(testigo sin alcohol) y el tratamiento 2(testigo con alcohol al 1%), no presentaron diferencias estadísticas, por lo tanto, el alcohol no interfirió en el crecimiento micelial del hongo *M. roleri*.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar estudios en campo, para evaluar la diseminación e inhibición del hongo *M. roleri* causante de la enfermedad moniliaisis.
- Dado los resultados bastante satisfactorios del extracto etanólico de manzanilla, probar en futuras investigaciones diferentes concentraciones.
- Realizar más estudios enfocados al uso de extractos botánicos con potencial antifúngico como una alternativa de control en el manejo de enfermedades fitopatógenas, bajo el contexto de una agricultura sustentable que minimice el impacto ambiental.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alegre, A., Bonifaz, E., Solange Lee, S., & Iannacone, J. (2017). SENSIBILIDAD DE DOS BIOCONTROLADORES CHRYSOPERLA EXTERNA Y CHRYSOPERLA CARNEA (NEUROPTERA: CHRYSOPIDAE) FRENTE AL EXTRACTO ACUOSO DE RUTA GRAVEOLENS (RUTACEAE). *The Biologist* , 173-180.
- Andrade, G., García, A., Cervantes, L., Aíl, C., Borboa, J., & Rueda, E. (2017). Estudio del potencial biocontrolador de las plantas autóctonas de la zona árida del noroeste de México: control de fitopatógenos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, vol. 49, núm. 1, 127-142.
- Aragón, S., & Beltrán, C. (2018). Los hongos endófitos en el control biológico de fitopatógenos e insectos plaga. En AGROSAVIA, *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: Agentes de control biológico* (págs. 854-877). Colombia: AGROSAVIA.
- Arcos, M., Martínez, L., Ortiz, G., Martínez, M., & Avendaño, C. (2019). EFECTO IN VITRO DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA LA MONILIASIS (Moniliophthora roreri) DEL CACAO (Theobroma cacao L.). *Rev. Agricultura Tropical Vol. 5 N*, 19-24.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3)*, 119-145.
- Bañuelos, R., Delgadillo, L., Echavarría, F., Delgadillo, O., & Meza, C. (2018). Composición química y FTIR de extractos etanólicos de Larrea tridentata, Origanum vulgare, Artemisa ludoviciana y Ruta graveolens. *Agrociencia vol.52 no.3*, 309-321.
- CUAMACAS VALLEJOS, R. E. (2013). “Efecto a la aplicación de tres fungicidas para el control de la pudrición blanca (Sclerotinia cepivorum) en el cultivo de cebolla burguesa en el sector la Paz provincia del Carchi.”. *tesis de grado (ingeniero agronomo)* . UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO, EL angel - Ecuador.
- Durán, E., & Dubón, A. (2016). *Tipos genéticos de cacao y distribución geográfica en Honduras*. La Lima, Cortés: FHIA.
- García, C., Kim, N., Bich, N., Tillan, J., Romero, J., López, O., & Moreno, V. (2009). Metabolitos secundarios en los extractos secos de Passiflora incarnata L.,



- Matricaria recutita L. y Morinda citrifolia L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1-7.
- Guerrero, R., Cevallos, O., Eguez, E., & Peñaherrera, S. (2020). El potencial del uso de microorganismos endofíticos como agentes de control de enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Centrosur*, 2-12.
- Hernández, E., Hernández, J., Avendaño, C., López, G., Garrido, E., Romero, J., & Nava, C. (2015). Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. *Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA*, 232-246.
- Kraus, U., ten Hoopen, M., Hidalgo, E., Martínez, A., Arroyo, C., García, J., . . . Sánchez, V. (2003). Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas Vol. 10 N°*, 52-58.
- Lanaud, C., Loor, G., Zarrillo, S., & Valdez, F. (2012). Origen de la domesticación del cacao y su uso temprano en el Ecuador. *Nuestro Patrimonio*, 12-14.
- Martínez de la Parte, E., & Pérez, L. (2015). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. *Rev. Protección Veg. Vol. 30*, 87-96.
- Mollocana, D., Erazo, M., Aguirre, X., & Torres, M. (2019). Molecular characterization of *Moniliophthora roreri*, causative agent of moniliasis in cocoa in three provinces of Ecuador: Los Ríos, Manabí and Santo Domingo de los Tsáchilas. *MOL2NET. International Conference on Multidisciplinary Sciences, 5th edition*, 1-3.
- Montes Mosquera, M. (2016). EFECTOS DEL FOSFORO Y AZUFRE SOBRE EL RENDIMIENTO DE MAZORCAS, EN UNA PLANTACIÓN DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) CCN-51, EN LA ZONA DE BABAHOYO". (tesis ingeniería agronomica). UNIVERSIDAD TECNICA DE BABAHOYO, BABAHOYO -Los RIOS.
- Moreira, M., Armijos, R., Cabrera, H., & Cueva, A. (2019). Germinación y multiplicación in vitro de *Matricaria recutita* L.: los fenoles totales determinan su germinación. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6-11.
- Moreno, C., Molina, I., Miranda, Z., Moreno, R., & Moreno, P. (2020). LA CADENA DE VALOR DE CACAO EN ECUADOR: UNA PROPUESTA DE

ESTRATEGIAS PARA COADYUVAR A LA SOSTENIBILIDAD.

*BIOAGRO*, 205-214.

- Pérez , G., Chimborazo , C., & Freile, J. (2015). Caracterización in situ de la variabilidad morfológica del cacao (*Theobroma cacao* L.) de la Provincia de Pastaza. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología Volumen 4 N°2*, 146-165.
- Pérez, E., Álvarez, C., Lares, M., Martínez, K., Suniaga, G., Pavani, A., & Guzmán , R. (2021). Cacao, cultura y patrimonio :un hábitat de aroma fino en Venezuela. *Rivar*, 146-162.
- Sánchez, V., Zambrano, J., & Iglesias, C. (2019). *La cadena de valor del cacao en América Latina y el Caribe*. Quito: INIAP.
- Suárez, Y., & Hernández, F. (2010). *MANEJO DE LAS ENFERMEDADES DEL CACAO (Theobroma cacao L), EN COLOMBIA CON ÉNFASIS, MONILIA (Moniliophthora roreri)*. Colombia: Corpoica.
- Torres , M., Ortiz, C., Téliz, D., Mora, A., & Nava, C. (2013). Efecto del Azoxystrobin Sobre *Moniliophthora roreri*, Agente Causal de la Moniliasis del Cacao (*Theobroma cacao*). *Rev. mex. fitopatol vol.31*, 65-69.
- Alcalá de Marcano, D., Vargas, N., & Pire, A. (2005). Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 315-324.
- Anzules , V., Borjas, R., Alvarado, L., Castro, V., & Julca, A. (2019). Control cultural, biológico y químico de *Moniliophthora* y *Phytophthora* spp en *Theobroma cacao* ‘CCN-51’. *Scientia Agropecuaria*, 511-520.
- Arvelo, M., Maroto , S., Delgado , T., Montoya , P., & González, D. (2017). *Manual técnico del cultivo de cacao: prácticas latinoamericanas*. San Jose , Costa Rica: IICA.
- Bailey, B., & Meinhardt, L. (2016). *Cacao diseases: a history of old enemies and new encounters*. Springer.
- Barrezueta, S., Prado, E., & Jimbo, R. (2017). Características Del Comercio De Cacao A Nivel Intermediario En La Provincia De El Oro-Ecuador. *European Scientific Journal June 2017 edition Vol.13*, 273-282.
- Campa, P., Vallejo, S., Corrales, C., Martínez, M., Vargas, I., & Ávila, G. (2017). Reducción en la incidencia de la pudrición gris en uva de mesa por el efecto

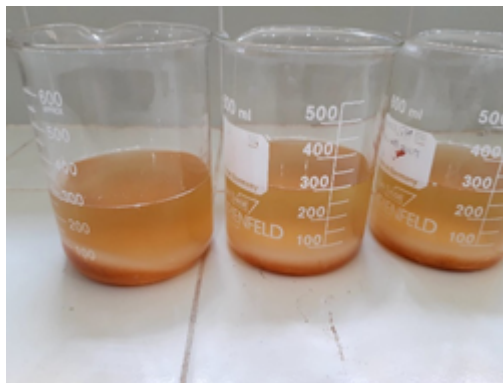
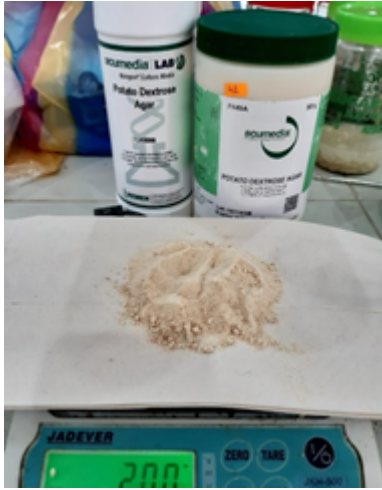
- de volátiles de un extracto de ajo. *Rev. mex. fitopatol vol.35 no.3 Texcoco*, 494-508.
- Celis, A., Mendoza, C., & Pachón, M. (2009). USO DE EXTRACTOS VEGETALES EN EL MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS, ENFERMEDADES Y ARVENSES. *Temas Agrarios* , 5-16.
- Chalacamá , J. (2016). Efecto del hidrolato de manzanilla (Matricaria chamomilla) en el manejo de Phytophthora infestans en el cultivo de papa variedad Superchola Centro Experimental San Francisco” Huaca-Carchi. *Trabajo de titulación previo la obtención del título de Ingeniero en Desarrollo Integral Agropecuario*. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI, TULCÁN - ECUADOR.
- Correa , J., Castro, S., & Coy, J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por Moniliophthora roreri en Colombia. *Acta Agronómica*. 63 , 388-399.
- De la Fuente de Diez Canseco, L., Muñoz , A., Valdizán , J., Zavaleta, J., Olivera , L., Gómez , J., . . . Cárdenas , M. (2018). *CACAO, TESORO DE LA AMAZONÍA*. LIMA: USIL.
- Estrada, W., Romero, X., & Moreno, J. (2011). *Guía técnica del cultivo de cacao manejado con técnicas agroecológicas”*. el salvador: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Fajardo, M., Morales, J., Correa, G., & Juan, L. (2016). EFFECT OF PLANT EXTRACTS AND GROWTH SUBSTRATES ON CONTROLLING DAMPING-OFF IN PINUS TECUNUMANII SEEDLINGS. *CERNE*, 317-324.
- Gamboa , j., Rodríguez , j., Gamboa, A., Duran, E., & Rojas, S. (2021). Evaluación agronómica de genotipos de Theobroma cacao L. en la Amazonia colombiana. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 244-255.
- Huaman, C., & Cabezas , O. (2019). Aceite de matico (Piper aduncum) en el control de Moniliophthora roreri agente causal de la moniliasis en cacao. *Peruvian Agricultural Research*, 53-57.
- Juárez, K., Díaz, E., Méndez, M., Pina, M., A.D., P., & Sánchez, M. (2019). EFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE AJO (Allium sativum) SOBRE EL DESARROLLO in vitro DE Aspergillus parasiticus Y Aspergillus niger. *Polibotánica*, 99-111.

- León, F., Calderón, J., & Mayorga, E. (2016). Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*, 45-55.
- López, A., Vélez, M., Sánchez, M., Bonilla, C., & Gallo, P. (2006). Evaluación de extractos vegetales para manejo de hongos patógenos en banano y fresa almacenados. *ACTA AGRON (COLOMBIA) VOL. 55*, 39-44.
- Lozada, B., Herrera, L., Perea, J., Stashenko, E., & Escobar, P. (2012). Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 102-110.
- Meneses, J., Soto, R., Espinosa, T., & Ramírez, M. (2008). OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDEOS DE FLOR DE MANZANILLA (*Matricaria recutita* L.). *AGROCIENCIA*, 425-433.
- Mesa, A., Marin, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *RIA*, 23-30.
- Pabón, M., Herrera, L., & Sepúlveda, W. (2016). CARACTERIZACIÓN SOCIO-ECONÓMICA Y PRODUCTIVA DEL CULTIVO DE CACAO EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER (COLOMBIA). *Revista Mexicana de Agronegocios*, vol. 38, 283-294.
- Pérez, V. (2018). *Moniliophthora roreri* H.C. Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Rev. Protección Veg.* vol.33, 1-13.
- QUEVEDO, C. (2016). ETIOLOGIA Y ENSAYOS DE ANTIESPORULACIÓN DE LA MONILIASIS (*Moniliophthora roreri* Cip y Par) EN FRUTOS DE CACAO, EN EL DISTRITO DE SAN JUAN DE BIGOTE PROVINCIA DE MORROPÓN DE BIGOTE PROVINCIA DE MORROPÓN. *tesis (ingeniero agronomo)*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA, Piura-Perú.
- Quintana, M., & Aguilar, J. (2018). Denominación de origen de cacao ecuatoriano: ¿un aporte de marketing global? *INNOVA Research Journal*, 68-76.
- Ramírez, L., Britos, M., Torres, A., & Karaben, V. (2018). *Estudio Fitoquímico de Extractos de llantén*. Mendoza-Argentina.
- Sánchez, M., Jaramillo, E., & Ramírez, I. (2015). *Enfermedades del Cacao*. MACHALA: UTMACH.

- Sánchez , F., & Garcés, F. (2012). Moniliophthora roreri (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*, 249 - 258.
- Sanchez , F., Medina, M., Díaz, G., Ramos, R., Vera, J., Vásquez, V., . . . Nodari, R. (2015). POTENCIAL SANITARIO Y PRODUCTIVO DE 12 CLONES DE CACAO EN ECUADOR. *Revista fitotecnia mexicana*, 38, 265-274.
- Solís , J., Zamarripa, A., Pecina, V., Garrido , E., & Hernández, E. (2015). Evaluación agronómica de híbridos de cacao (Theobroma cacao L.) para selección de alto rendimiento y resistencia en campo a moniliasis. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.6*, 71-82.
- Suarez, C., & Delgado, J. (1993). *Moniliasis del cacao* . Ecuador: INIAP.
- Valle, R. R., & De Almeida, A. (2007). Ecofisiología del árbol del cacao. *Revista Brasileña de Fisiología Vegetal*, 426-448.
- Villacís, L., León, O., Santana, R., Mangui, J., Carranza , G., & Pazmiño , P. (2017). Actividad anti fúngica (in vitro) de extractos vegetales para el control de antracnosis (Colletotrichum acutatum). *J Selva Andina Biosph*, 59-64.

## ANEXOS

### Anexo 1. Preparación de medio de cultivo (PDA)



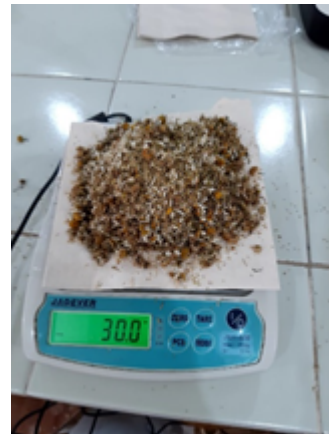
### Anexo 2. Secado de plantas en estufa



**Anexo 3.** Aislamiento y purificación del hongo *M.roreri*.



**Anexo 4.** Triturado y macerado de extractos botánicos



**Anexo 5.** Llenado de botellas 99ml PDA



**Anexo 6.** Plaqueo, extracción y aplicación de 1ml de extracto etanólico botánico para cada tratamiento.







**Anexo 7.** Inoculación y siembra del hongo *M. roreri* en los diferentes tratamientos.



**Anexo 8.** Crecimiento micelial luego de 15 días en los diferentes tratamientos.

