



# UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

## FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

### CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario.

#### **Título del Proyecto de Investigación:**

“Uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control *in vitro* de la monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par)”.

#### **Autor:**

Kevin Saul Freire Segura

#### **Director del Proyecto de Investigación:**

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.

**Quevedo - Los Ríos - Ecuador**

**2017**

## **DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, Kevin Saul Freire Segura, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi auditoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que eh consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la ley de propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad vigente.

---

**Kevin Saul Freire Segura**

**C.I. 1205736869**

# **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

El suscrito, Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc. Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el egresado Kevin Saul Freire Segura, realizó el proyecto de investigación de grado titulado **“Uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control *in vitro* de la monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par)”** previo a la obtención del título de Ingeniería Agropecuaria, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

---

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.  
**DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

# CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Dando cumplimiento al Reglamento de la Unidad de Titulación Especial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y a las normativas y directrices establecidas por el SENESCYT, el suscrito Ing. M.Sc. Jorge Gustavo Quintana Zamora, en calidad de Director del Proyecto de Investigación de Grado “Uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control *in vitro* de la monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par)”. De autoría del estudiante Kevin Saúl Freire Segura, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 8%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



## Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** “Uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control *in vitro* de la monilla (*Moniliophthora roreri* L.)”.docx (D29518987)  
**Submitted:** 2017-06-29 04:32:00  
**Submitted By:** jquintana@uteq.edu.ec  
**Significance:** 8 %

### Sources included in the report:

WILLIAN DENNIS ALARCON MONSERRATE 22.02.2016.docx (D18126163)  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99652008000100012](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000100012)  
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5399608.pdf>

### Instances where selected sources appear:

8

---

Ing. Jorge Gustavo Quintana Zamora, M.Sc.  
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título:**

**“Uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control *in vitro* de la monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par)”**,

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria.

Aprobado por:

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**  
Dr. Gregorio Vasconez Montufar

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**  
Ing. Jaime Vera Chang. M.Sc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**  
Ing. Gerardo Segovia Freire

**Quevedo – Los Ríos – Ecuador**

**2017**

## **AGRADECIMIENTO**

Infinitamente agradecido con Dios, quien ha derramado bendiciones sobre mí, cada día me ha sabido guiar para cumplir cada meta que me he propuesto. Gracias una vez más señor mi Dios por traerme hasta aquí.

A mis padres Rebeca Segura Castillo, Edgar Freire Álvarez, quienes han siempre han estado pendiente de mí aconsejándome desde muy pequeño, porque siempre se han preocupado por darme la mejor herencia que es el estudio, siempre han estado apoyándome en cada paso que doy en mi vida.

A mi familia en general que siempre se han preocupado por mi bienestar, apoyándome para que no desmaye y poder cumplir una más de mis metas.

Agradezco a los docentes y autoridades que han colaborado en mi formación profesional. Expreso mis sinceros agradecimientos al Ing. Jorge Quintana y al Dr. Gregorio Vásquez por su valioso tiempo, paciencia y atención en la realización de la investigación. A mis amigos y compañeros en especial a Susana Espín, Nuria Buste y Diana Castillo quienes han estado presentes ayudándome para cumplir con esta meta.

## DEDICATORIA

*Dedicado a mis padres Rebeca Segura Castillo y Edgar Freire Álvarez por ser las personas que han estado como propulsores en mi vida, por la incansable lucha para que yo pueda alcanzar una más de mis metas.*

*A mis hermanas Kelly Freire Segura y Gema Freire Segura. A mi familia en general que siempre estuvieron preocupados por mi futuro profesional.*

## RESUMEN

Se evaluó el uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control *in vitro* de la monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par), en el Laboratorio de Rumiología en el área de Microbiología, donde se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $3 \times 2 + 1$  con 7 tratamientos y 4 repeticiones con el propósito de identificar el método y extracto más eficiente sobre el control del hongo *M. roreri*. Al analizar el uso de dos métodos de extracción se observa que el método de maceración a base del extracto de Ortiga (*Urtica dioica*) presentó ser más eficiente en el control *in vitro* de monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par), de la misma forma el T7 (Maceración de Ortiga) predominó de los demás tratamientos al presentar el menor crecimiento radial del hongo con 12,75 mm a las 168 horas de siembra, mientras que el mayor porcentaje de inhibición del hongo sobre el control fúngico de la monilla lo presenta el método de extracción de infusión con 76,69% y en cuanto al extracto el más eficiente fue la ortiga con 84,09% de inhibición.

**Palabras claves:** métodos de extracción, extractos fitoquímicos, jengibre, oreganón, ortiga, *in vitro*, PDA.

## ABSTRACT AND KEYWORDS

Was assessed using two methods of extracting phytochemicals from ginger (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) and nettle (*Urtica dioica*), for the in-vitro control of the monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par), in the Laboratory of Rumiologia in the area of Microbiology, where a design was used in accordance with randomized factorial  $3 \times 2 + 1$  with 7 treatments and 4 replications with the purpose of identifying the method and extract more efficient control of the fungus *M. roreri*. Analyzing the use of two methods of extraction is observed that the method of maceration with stinging nettle (*Urtica dioica*) extract He appeared to be more efficient in controlling in-vitro monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par), in the same way the T7 (maceration of nettle) It dominated other treatments to lower radial growth of the fungus with 12.75 mm to the 168 hours of planting, while the largest percentage of inhibition of the fungus on the fungal control the monilla presents this infusion with 76,69% and in terms of the summary extraction method the most efficient was ortiga with 84,09% inhibition.

Key words: extraction methods, phytochemical extracts, ginger, oregano, nettle, in vitro, PDA.

## TABLA DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO .....	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA .....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT AND KEYWORDS.....	ix
TABLA DE CONTENIDO .....	x
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
CÓDIGO DUBLÍN .....	xvi
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	3
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	3
1.1.1. Planteamiento del problema.....	4
1.1.2. Formulación del problema. ....	4
1.1.3. Sistematización del problema. ....	5
1.2. Objetivos. ....	5
1.2.1. Objetivo General.....	5
1.2.2. Objetivos Específicos.....	5
1.3. Justificación.....	6
CAPÍTULO II .....	7
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
2.1. Marco conceptual. ....	8
2.2. Marco referencial.....	10
2.2.1. El cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.).....	10
2.2.2.1. Descripción botánica .....	11
2.2.2. Importancia económica del cacao en Ecuador. ....	12
2.2.3. Monilla.....	13

2.2.3.1. Origen.....	13
2.2.3.2. Morfología.....	13
2.2.3.3. Sintomatología y ciclo de vida. ....	14
2.2.3.4. Impacto económico. ....	14
2.2.4. Métodos de control. ....	15
2.2.4.1. Control cultural.....	15
2.2.4.2. Control químico.....	15
2.2.4.3. Control biológico.....	16
2.2.4.4. Control genético. ....	17
2.2.6. Extractos vegetales.....	18
2.2.7. .Control de monilla mediante el uso de extractos vegetales. ....	19
2.2.8. Oreganón ( <i>Plectranthus amboinicus</i> ). ....	19
2.2.8.1. Clasificación Taxonómica.....	20
2.2.8.2. Generalidades. ....	20
2.2.8.3. Composición química.....	20
2.2.8.4. Mecanismo de acción. ....	21
2.2.8.5. Método de extracción. ....	21
2.2.9. Jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> L.).....	21
2.2.9.1. Clasificación taxonómica. ....	22
2.2.9.2. Principio activo.....	22
2.2.10. Ortiga ( <i>Urtica dioica</i> ).....	22
2.2.10.1. Principio activo. ....	23
CAPÍTULO III.....	24
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	24
3.1. Localización. ....	25
3.2. Tipos de investigación.....	25
3.3. Métodos de investigación.....	25
3.4. Fuente de recopilación de información. ....	26
3.5. Diseño de la investigación.....	26
3.6. Instrumento de investigación.....	27
3.7. Variables evaluadas. ....	27
3.7.1. Crecimiento radial del hongo.....	27
3.8. Manejo del experimento. ....	28
3.8.1. Recolección del hongo.....	28
3.8.2. Preparación del medio PDA y esterilización de los materiales a utilizar en el trabajo. ....	28

3.8.3. Aislamiento del hongo en laboratorio.....	28
3.8.4. Selección y recolección de las especies vegetales (Oreganón, Jengibre y Ortiga). .....	29
3.8.5. Preparación de los extractos vegetales.....	29
3.8.5.1. Infusión.....	30
3.8.5.2. Maceración.....	30
3.8.6. Siembra del patógeno en las cajas que contienen extracto más PDA. ....	30
3.9. Tratamiento de los datos.....	30
3.10. Recursos humanos y materiales. ....	31
3.10.1. Materiales de laboratorio.....	31
CAPÍTULO IV.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4.1. Resultados y discusión. ....	33
4.1.1. Crecimiento radial de hongo. ....	33
4.1.2. Porcentaje de inhibición.....	36
CAPÍTULO V.....	40
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	40
5.1. Conclusiones. ....	41
5.2. Recomendaciones.....	42
CAPÍTULO VI.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	43
6. BIBLIOGRAFÍA.....	44
CAPÍTULO VII.....	53
7. ANEXOS.....	53
7.1. Anexos de análisis de varianza.....	54
7.2. Fotografías de la investigación.....	57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. <i>Taxonomía del Cacao.</i> .....	10
2. <i>Taxonomía del oreganón.</i> .....	20
3. <i>Taxonomía del jengibre.</i> .....	22
4. <i>Taxonomia de la ortiga.</i> .....	22
5. <i>Descripción de los tratamientos.</i> .....	26
6. <i>Esquema de Análisis de Varianza</i> .....	27
7. <i>Especies vegetales seleccionadas.</i> .....	29
8. <i>Efecto de métodos de extracción para el control in vitro de monilla sobre el crecimiento radial del hongo.</i> .....	33
9. <i>Efecto de los extractos vegetales en el crecimiento radial de la monilla</i> .....	34
10. <i>Interacción de los tratamientos evaluados sobre el crecimiento radial del hongo.</i> .....	35
11. <i>Efecto del método de extracción (Factor A) sobre el porcentaje de inhibición a las 168 horas para el control in vitro de monilla.</i> .....	36
12. <i>Efecto de extractos vegetales (Factor B) sobre el porcentaje de inhibición a las 168 horas para el control in vitro de monilla.</i> .....	37
13. <i>Interacción de los tratamientos evaluados sobre el porcentaje de inhibición que presentaron los métodos y extractos sobre el control in vitro de monilla.</i> .....	38

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 48 horas después de la siembra. ....</i>	54
2. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 72 horas después de la siembra. ....</i>	54
3. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 96 horas después de la siembra. ....</i>	54
4. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 120 horas después de la siembra. ....</i>	55
5. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 144 horas después de la siembra. ....</i>	55
6. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 168 horas después de la siembra. ....</i>	55
7. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable porcentaje de inhibición que fue tomado al séptimo día (168 horas) después del crecimiento. ....</i>	56
8. <i>Cronograma de actividades donde se detallaron las realizadas en la investigación. ....</i>	56
9. <i>Corte y desinfección del material vegetal que contiene el hongo para la siembra en la caja Petri que contiene el medio PDA. ....</i>	57
10. <i>Recolección de las especies vegetales en campo. ....</i>	57
11. <i>Lavado de las especies vegetales con agua corriente para luego lavarlas con cloro, alcohol y enjuagado con agua estéril. ....</i>	58
12. <i>Control de temperatura del agua utilizando un termómetro para la preparación del extracto mediante el método de infusión. ....</i>	58
13. <i>Corte del material vegetal para realizar la maceración. ....</i>	59
14. <i>Maceración de las especies vegetales previamente desinfectadas utilizando un mortero. ....</i>	59
15. <i>Extractos vegetales preparados por los métodos infusión y maceración contenidos en matraces de 1000 mL. ....</i>	60
16. <i>Llenado de las cajas Petri con el medio PDA mas los extractos vegetales y siembra del hongo en el medio. ....</i>	60

17.	<i>Incubación de las cajas rotuladas con sus debidos tratamientos y repeticiones en una estufa a 30.5 °C.....</i>	61
18.	<i>Medición del crecimiento radial del hongo con la utilización de un calibrador cada 24 horas después de la siembra del hongo. ....</i>	61
19.	<i>Registro de los datos obtenidos en la medición del crecimiento radial del hongo.....</i>	62

## CÓDIGO DUBLÍN

<b>Título:</b>	“Uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> L.), Oreganón ( <i>Plectranthus amboinicus</i> ) y Ortiga ( <i>Urtica dioica</i> ), para el control <i>in vitro</i> de la monilla ( <i>Moniliophthora roreri</i> Cif & Par)”.						
<b>Autor:</b>	Kevin Saul Freire Segura						
<b>Palabras claves:</b>	método de extracción	extractos fitoquímicos	jengibre	oreganón	ortiga	<i>in vitro</i>	PDA
<b>Fecha de publicación:</b>							
<b>Editorial:</b>	Quevedo: UTEQ,2017						
<b>Resumen:</b>	<p>Se evaluó el uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (<i>Zingiber officinale</i> L.), Oreganón (<i>Plectranthus amboinicus</i>) y Ortiga (<i>Urtica dioica</i>), para el control <i>in vitro</i> de la monilla (<i>Moniliophthora roreri</i> Cif &amp; Par), en el Laboratorio de Rumiología en el área de Microbiología, donde se empleó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2+1 con 7 tratamientos y 4 repeticiones con el propósito de identificar el método y extracto más eficiente sobre el control del hongo <i>M. roreri</i>. Al analizar el uso de dos métodos de extracción se observa que el método de maceración a base del extracto de Ortiga (<i>Urtica dioica</i>) presentó ser más eficiente en el control <i>in vitro</i> de monilla (<i>Moniliophthora roreri</i> Cif &amp; Par.), de la misma forma el T7 (Maceración de Ortiga) predominó de los demás tratamientos al presentar el menor crecimiento radial del hongo con 12,75 mm a las 168 horas de siembra, mientras que el mayor porcentaje de inhibición del hongo sobre el control fúngico de la monilla lo presenta el método de extracción de infusión con 76,69% y en cuanto al extracto el más eficiente fue el de ortiga con 84,09% de inhibición.</p>						

	<p><b>Palabras claves:</b> métodos de extracción, extractos fitoquímicos, jengibre, oreganón, ortiga, <i>in vitro</i>, PDA.</p> <p>Was assessed using two methods of extracting phytochemicals from ginger (<i>Zingiber officinale</i> L.), Oreganón (<i>Plectranthus amboinicus</i>) and nettle (<i>Urtica dioica</i>), for the in-vitro control of the monilla (<i>Moniliophthora roreri</i> Cif &amp; Par), in the Laboratory of Rumiología in the area of Microbiology, where a design was used in accordance with randomized factorial 3 x 2 + 1 with 7 treatments and 4 replications with the purpose of identifying the method and extract more efficient control of the fungus <i>M. roreri</i>. Analyzing the use of two methods of extraction is observed that the method of maceration with stinging nettle (<i>Urtica dioica</i>) extract He appeared to be more efficient in controlling in-vitro monilla (<i>Moniliophthora roreri</i> Cif &amp; Par), in the same way the T7 (maceration of nettle) It dominated other treatments to lower radial growth of the fungus with 12.75 mm to the 168 hours of planting, while the largest percentage of inhibition of the fungus on the fungal control the monilla presents this infusion with 76,69% and in terms of the summary extraction method the most efficient was ortiga with 84,09% inhibition.</p> <p>Key words: extraction methods, phytochemical extracts, ginger, oregano, nettle, in vitro, PDA.</p>
<b>Descripción</b> :	
<b>Uri:</b>	

## INTRODUCCIÓN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los cultivos más importantes para el Ecuador, atendiendo con su producción el 5% de la demanda mundial, siendo uno de los cultivos tradicionales de interés comercial, social y económico en la provincia de Los Ríos (1). La importancia de este radica en que se cultiva desde época de la colonia además de formar parte de la cadena agrícola, por su participación en los productos de exportación no petrolera y el gran número de derivados con valor agregado (2,3).

Sin embargo, la productividad del cultivo de cacao se ha visto afectada en los últimos tiempos debido a las afecciones de naturaleza fúngica, que combinadas con los cambios climáticos provoca enfermedades de alto impacto como la Monilla, la cual ocasiona grandes pérdidas económicas a los productores cacaoteros (4).

La monilla es causada por el hongo *Moniliophthora roreri* que infecta exclusivamente a frutos jóvenes de cacao y de otras especies afines, ataca directo a las semillas que son el producto de interés comercial, pues su rápida diseminación y los graves daños que ha causado en once países tropicales han incrementado la preocupación a otros continentes (5), este hongo se encuentra actualmente en una fase invasiva y ha ampliado recientemente su área geográfica (6,7), la enfermedad es económicamente perjudicial en diversos países, como Ecuador (8), Costa Rica (9), Perú (10) y Honduras (11), ya que el daño producido a gran escala podría resultar una eventual propagación de *M. roreri* en los diferentes países productores de cacao.

Actualmente no existe información suficiente, sobre el ciclo de vida del patógeno, métodos o estrategias de control biológico sobre este, por lo que surge realizar investigaciones que aporten conocimientos en la formación de nuevas bases relacionadas a esta área (12).

Se muestra interés en el uso de extractos vegetales como alternativa de control en la monilla, ya que las plantas contienen principios activos en sus órganos, los cuales extraídos y aplicados en forma adecuada, producen efectos positivos que permiten el manejo de plagas y microorganismos fitopatógenos (13), además de brindar alternativas en el control

biológico de la monilla, pues los altos costos de funguicidas sintéticos repercuten en la economía de los productores y terminan causando contaminación a nivel ambiental (14).

Es por ello que se planteó realizar esta investigación con el fin de desarrollar dos métodos de extracción obtenidos de Jengibre (*Zingiber officinale* L.) Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*) como control biológico sobre la monilla en cacao, de modo que se verifique la efectividad de los extractos vegetales, los cuales puedan incorporarse en una alternativa de control orgánico en el cacao y así abaratar costos a los productores generando un bajo impacto ambiental sobre el cultivo.

## **CAPÍTULO I**

# **CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problema de investigación.**

### **1.1.1. Planteamiento del problema.**

El cultivo de cacao presenta problemas en su producción debido a las enfermedades, principalmente la presencia del hongo *M. royeri* causante de pérdidas en mazorcas de la huerta hasta el 80% de la producción (15). El control químico ha causado durante mucho tiempo afectaciones tanto a la salud de las personas que manipulan estos productos agroquímicos como a quienes consumen los diferentes tipos de derivados del cacao. Así también presenta desventajas como en el factor económico porque la mayoría de los pequeños productores no están en capacidad económica de acceder a estos productos sintéticos. A más de que el control químico causa severos daños a la salud, también la falta de capacitación al productor sobre cómo manipular y realizar correctamente las aplicaciones son un potencial riesgo para la salud humana y ambiental.

#### **Diagnóstico.**

Entre muchas enfermedades fúngicas que ataca el cultivo del cacao está la monilla, considerada como una de las enfermedades más severas que ha causado enormes pérdidas económicas a los productores durante muchos años en especial en la época del invierno. Esta enfermedad se desarrolla cuando se encuentra en un ambiente favorable (humedad 80% – temperatura 10 – 20 °C). La monilla ha causado un alto costo de producción, baja rentabilidad debido a los bajos precios, causando severas pérdidas a los productores y deterioro ambiental

#### **Pronóstico.**

La obtención de los extractos vegetales puede verse afectado si no se realiza correctamente la extracción, así como también se puede contaminar el medio de cultivo mediante la realización del trabajo.

### **1.1.2. Formulación del problema.**

- ¿Será posible inhibir el crecimiento del hongo *M. royeri* en condiciones controladas con la aplicación de extractos vegetales?

### **1.1.3. Sistematización del problema.**

- ¿Cuál será el método de extracción fitoquímico más eficaz que asegure el control del hongo *M. roreri*?
- ¿Cuánto será el crecimiento radial del hongo inoculado en los tres extractos vegetales?
- ¿Cuánto será el porcentaje de inhibición del hongo *M. roreri*?

## **1.2. Objetivos.**

### **1.2.1. Objetivo General.**

Evaluar el uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control *in vitro* de la monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par).

### **1.2.2. Objetivos Específicos.**

- Identificar el método de extracción fitoquímico más eficiente en el control *in vitro* de la monilla.
- Analizar el crecimiento radial del hongo *M. roreri* inoculado en los tres extractos vegetales.
- Evaluar el porcentaje de inhibición del hongo *M. roreri* en el control fúngico de la monilla con extractos vegetales.

### **1.3. Justificación.**

Se requiere realizar la investigación debido a que la producción cacaotera ha sido afectada durante décadas por este problema y es importante realizar investigaciones enfocadas en alternativas orgánicas para el control de esta enfermedad que perjudica a los productores y al deterioro del ambiente, debido al uso de fungicidas químicos.

Teniendo en cuenta las pérdidas económicas que se presentan en el cultivo de cacao a causa del hongo *M. royeri*, se motiva a la investigación exploratoria usando alternativas orgánicas para el control de esta enfermedad en condiciones *in vitro*, en este caso la extracción de las propiedades anti-fúngicas del Jengibre *Zingiber officinale* L., Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), las cuales se someterán a diferentes tipos de extracción para identificar el extracto y el método de extracción más eficaz.

Desde el punto de vista metodológico se realizará la investigación con metodologías teóricas y prácticas para analizar la situación existente en el campo.

Esta investigación tiene como propósito dar alternativas orgánicas para el control de esta enfermedad de manera eficaz reduciendo las pérdidas económicas. La investigación beneficiará de manera directa a los productores de cacao ya que obteniendo buenos resultados tendrá aceptación para el control de la monilla.

## **CAPÍTULO II**

### **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.**

## **2.1. Marco conceptual.**

### **Epidemiología.**

Estudio de poblaciones de patógenos en poblaciones de hospedantes y de la enfermedad resultante de esta interacción, bajo la influencia del medio ambiente y la interferencia humana (16).

### **Fungicida.**

Es un tipo particular de plaguicida que controla enfermedades fúngicas perjudiciales en las plantas, inhibiendo o eliminando al hongo que causa la enfermedad (17).

### **Monilla.**

Enfermedad causada por el hongo *Moniliophthora roreri* que infecta exclusivamente a frutos jóvenes de cacao, ocasionando grandes pérdidas al cultivo (5).

### **Extracto vegetal.**

Es un preparado líquido en el cual se concentran los principios activos de las plantas o vegetales, cuya acción sirve para ser aplicado contra plagas, o enfermedades que generen daños (18).

### **Jengibre.**

El jengibre (*Zingiber officinale* L.) es una planta de la familia de las zingiberáceas, cuyo tallo subterráneo es un rizoma horizontal muy apreciado por su aroma y sabor picante. La planta llega a tener 90 cm de altura, con largas hojas de 20 cm (19).

### **Ortiga.**

Planta arbustiva perenne, dioica, de semblante tosco y que puede adquirir hasta 1,5 m de altura. Una particularidad de esta planta es poseer unos pelos urticantes. Tienen la forma de pequeñísimas ampollas de un líquido irritante, que al contacto con la piel provocan una lesión y dispersan su contenido sobre ella induciendo ronchas, escozor y prurito (20).

### **Oreganón.**

Planta herbácea o sufruticosa, perenne, rizomatosa, cuyas hojas y sumidades floridas se aplican en el campo farmacéutico debido a las propiedades tónicas, amargoexcitantes, antisépticas, diuréticas y antiespasmódicas (21).

### ***In vitro.***

Del latín dentro del vidrio, que indica una técnica para realizar un determinado fin bajo condiciones estériles y estas pueden ser de plantas, semillas, embriones, órganos, explantos, células y protopláastos.

## 2.2. Marco referencial.

### 2.2.1. El cacao (*Theobroma cacao* L.).

El cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.), fue iniciado por los indígenas en México y Centroamérica, mucho antes del descubrimiento de América. Lo consumían como una bebida llamada xocoatl, que al principio por su sabor amargo no agrado a los españoles: Sin embargo para el año 1550 éstos añadieron dulce y vainilla al chocolate lo que hizo que el uso y demanda de esta pepa se extendiera por todo el mundo (22).

**Tabla 1.** *Taxonomía del Cacao.*

---

REINO	Plantae
SUBREINO	Tracheobionta
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUBCLASE	Dilleniidae
ORDEN	Malvales
FAMILIA	Sterculiaceae
SUBFAMILIA	Byttnerioideae
GENERO	Theobroma
ESPECIE	cacao

---

FUENTE: ALARCÓN (22).

El cacao es considerado como uno de los cultivos perennes más importantes del mundo y es explotado comercialmente para la producción de semillas principalmente destinadas a la fabricación de chocolate, además de su gran potencial en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. La producción mundial del grano de cacao ha decaído debido a cambios en las condiciones de clima de las principales zonas productoras como África Occidental y Sudamérica, problemas fitosanitarios, falta de inversión, envejecimiento de las plantaciones e inadecuada fertilización (23).

El grano de cacao se extrae de la baya ovoidea grande, que es el fruto caulinar del árbol de cacao, *Theobroma cacao* es originario de la cuenca alta del Amazonas. El árbol es de

tamaño mediano, aunque puede alcanzar hasta unos veinte metros de alto. Tradicionalmente, el cacao es cultivado en los países productores y vendidos a la exportación en forma de habas. La transformación del cacao para la fabricación de productos terminados o semi acabados (manteca de cacao, licor de cacao, cacao en polvo, chocolate, etc.) se efectúa en los países importadores. Sin embargo, ciertos países productores tales como Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Brasil se lanzan desde hace algunos años a la trituration local de su producción a fin de gozar de una plusvalía a la exportación (24).

#### **2.2.2.1. Descripción botánica.**

**Planta.** El cacao, *Theobroma cacao* es una planta de la familia de las esterculiáceas, planta de hasta 20 metros de altura cuando crece libremente bajo la sombra (22).

**Raíz.** La principal es pivotante o sea que penetra hacia abajo, especialmente en los primeros meses de vida de la planta puede crecer normalmente entre 120 a 150 cm. Luego nacen muchas raíces secundarias. La mayoría de las raicillas funcionales del árbol, se encuentran en la superficie del suelo (25).

**Tallo.** Es recto y se puede desarrollar en formas muy variadas, según las condiciones ambientales, y manejo de la plantación. Por lo general, el cacao clonal, que proviene de una ramilla un acodo o un injerto, en cuyo caso la planta toma otra forma, sin un tallo principal. Si se le deja crecer libremente, la planta emite chupones. Este chupón adquiere el papel del tallo principal crece vigorosamente, con el tiempo elimina el molinillo verticilo del piso anterior del que sale (25).

**Hojas.** Son simples, enteras y pigmentadas, variando mucho el color de esta pigmentación, la mayoría es de color verde bastante variable. Algunas plántulas tienen hojas tiernas bien pigmentadas (coloreadas) que pueden llegar a ser de un color marrón claro, morado o rojizo; también las hay de color verde pálido (casi sin coloración). El tamaño de la hoja varía mucho, con una alta respuesta al ambiente (26).

**Flores.** Sus flores son pequeñas, aparecen en pequeños racimos que se forman en el tronco y en las ramas más viejas, la flor tiene cinco pétalos, cinco estambres y un pistilo. Solo una treintena de las aproximadamente 6000 flores que se abren durante el año llegan a formar semillas. Estas, llamadas a veces habas del cacao, están encerradas en una mazorca (26).

**Los frutos.** Son una drupa bastante grande, le sostiene un pedúnculo no muy largo pero robusto, que se origina del crecimiento del pedicelo de la flor. Los frutos tienen cinco lóculos y cada lóculo tiene dos partes formados por dos surcos interno, lo que en algunos es evidente y en otros casi ha desaparecido. El color de los frutos varía notablemente desde casi blancos y verdes hasta colores morados bien fuertes, también hay combinaciones de colores morados con verdes especialmente diferenciando lomos y surcos (27).

**Semillas.** Estas son de forma oblonga y pueden variar mucho en tamaño. Algunas, en la parte más larga son redondeadas como en el caso del cacao tipo Criollo y del Nacional de Ecuador otras son bastante aplanadas como en el caso de los Forasteros. Tienen un recubrimiento o cutícula que protege a los cotiledones y en la parte exterior está el mucilago que permite la fermentación de las semillas. El color de la semilla también es muy variable desde un blanco ceniciento, blanco puro, hasta un morado oscuro y todas las tonalidades (27).

### **2.2.2. Importancia económica del cacao en Ecuador.**

El cultivo de cacao ha tenido una enorme trascendencia como fuente de ingreso de divisas para el País, principalmente en el siglo pasado, cuando las plantaciones se encontraban en sus mejores años de vida y sin problemas de enfermedades; siendo así que por el año de 1911 con volúmenes de exportación en el orden de 46000 toneladas, nuestra exportación significó el 20% de la producción mundial y el 75% de total de divisas que ingresaron al país provenientes de la exportación de productos agrícolas (28).

Mientras (28), menciona que en el transcurso del tiempo la productividad de cacao disminuyó considerablemente debido a la aparición de las enfermedades de Monialisis en 1915 y Escoba de Bruja en 1918, las mismas que causaron pérdidas de más del 80% de la producción, azotando las plantaciones de cacao en el Ecuador a tal punto que en 1940 nuestro nivel de exportación pasó a ser el 2% de la producción mundial.

Además el Ecuador es el primer productor mundial de cacao (*Theobroma cacao* L.) de alta calidad, conocido en los mercados internacionales como Sabor Arriba, sin embargo aún existen graves problemas en la producción de cacao debido al inadecuado y escaso manejo agronómico de las cacaoteras, como también el uso de materiales genéticos de baja productividad y alta susceptibilidad a enfermedades (29).

### **2.2.3. Monilla.**

#### **2.2.3.1. Origen.**

En un principio se consideró que Ecuador era el centro de origen de la enfermedad, pues en esa época (1917), el fitopatólogo J. B. Rorer viajó desde Trinidad hasta Ecuador recolectando muestras en busca de una explicación a la reducción que se presentó en la producción cacaotera. Las muestras fueron enviadas al investigador R. E. Smith en la Universidad de California, el cual determinó que la enfermedad era causada por el patógeno Monilla (30).

En 2005, se consideró que la Monilla del cacao tuvo su origen en 1817 en el departamento de Santander (Colombia) y en Antioquia se registró en 1851, pues en el 2007 se encontraron reportes de la enfermedad en 1832, 1850 y 1956 en Norte de Santander, y 1916 y 1949 en Antioquia que apoyan la hipótesis anterior (5).

Así en un trabajo más reciente, en estudios genéticos basados en polimorfismos de fragmentos largos amplificados (AFLP) y datos de secuencias intergénicas (ITS) encontraron una alta diversidad genética de *M. roreri*, lo que aumenta las evidencias para señalar a Colombia como la región de origen (31).

#### **2.2.3.2. Morfología.**

Este hongo (*Moniliophthora roreri*) caracteriza por ser mitospórico dentro de los Agaricales, estudios realizados por microscopía electrónica revelaron que este hongo presenta una única es permatogénesis basipetal, como en Monilia (antiguo termino referido al género *Moniliophthora*) y posee septos dolíporos en el micelio. Esto fue considerado como el estado mitótico (anamorfo) de un basidiomycete (32).

En estudios citológicos se ha observado que las conidias han sido postuladas a servir como meiosporas; lo que sugiere que estas esporas representan un basidium modificado el cual perdió la forma, espesor y carnosidad del basidiocarpio, formando solo un pileus vestigial. Las esporas son multifuncionales y sirven no solo para el intercambio genético sino también para la dispersión, infección y sobrevivencia (33).

### **2.2.3.3. Sintomatología y ciclo de vida.**

En zonas de cultivo de cacao, la infección se presenta en la superficie de los frutos y en cualquier fase de desarrollo vegetativo, sin embargo la susceptibilidad más alta se observa en los primeros estados de desarrollo del fruto (34).

Una vez que penetra el fruto, el patógeno se desarrolla intracelularmente e invade las células del parénquima cortical, esta fase es considerada el período más largo de incubación de la enfermedad (35). Con el tiempo los síntomas aumentan en severidad y favorecen el crecimiento del patógeno el cual, finalmente, después de varios meses de la inoculación, es fácilmente observado en la superficie del fruto donde produce anomalías de formas geométricas y protuberancias o tumores (32,36)

Las condiciones ambientales también juegan un rol fundamental en el avance de *M. royeri*; El ciclo se inicia en el momento que la humedad ambiental es baja (época seca), donde se generan millones de esporas. Luego, estas conidio esporas son diseminadas por el viento y la lluvia las depositan en la superficie de las hojas y frutos del hospedero (34).

Los conidios germinan en ambientes húmedos y a temperaturas superiores a 24 °C, en un lapso de seis a ocho horas, seguido por la penetración en la epidermis usando las hifas infectivas. Es así como las hifas se dirigen hacia los tejidos centrales (mesodermo y semillas) para inducir la producción de proteínas relacionadas con la necrosis, provocando la muerte del tejido interno y posteriormente, el externo (36,37).

El hongo permanece como una espora asexual en las mazorcas viejas enfermas, entre la estación húmeda y seca, se cree que en Ecuador el viento es el principal agente de dispersión (38).

### **2.2.3.4. Impacto económico.**

Esta enfermedad fúngica ataca solamente los frutos del cacao y se considera que constituye uno de los factores principales por ser un limitante en la producción del cultivo, ya que sin la existencia de un control, la enfermedad puede provocar pérdidas que oscilan entre un 16 y 80% de la producción. La severidad del ataque de la monilia varía según la zona y época del año, de acuerdo con las condiciones del clima; aparentemente las temperaturas altas son más favorables para la diseminación del hongo (39).

#### **2.2.4. Métodos de control.**

Existen diversas técnicas de manejo que permiten realizar un control parcial de la enfermedad, pues todas tienen como objetivo eliminar por completo el inóculo del patógeno, sin embargo sólo alcanzan a reducir los daños. Los métodos usados varían sólo en el proceso y la herramienta base, otorgando un nombre según el modo de aplicación (40).

##### **2.2.4.1. Control cultural.**

Este método de control consiste en realizar podas frecuentes y ligeras a los árboles, controlar la sombra del cultivo y remover los frutos con síntomas para su posterior incineración (41). Adicionalmente se propuso una frecuencia con la que se deberían hacer las remociones de los frutos, teniendo en cuenta los síntomas de la enfermedad, la época del año y la metodología de poda (42,43).

Luego se recomendó realizar la remoción de frutos con síntomas cada siete días, evitando de esta manera que el hongo alcanzara la fase de esporulación y diseminación de sus esporas a frutos sanos (44). Y finalmente se recomendó hacer podas de mantenimiento, por lo menos dos veces al año, justo después de la cosecha para incrementar el número de flores y frutos en los árboles (45).

Además las prácticas de cultivo conducen a una modificación del ambiente, tornándolo inapropiado para el desarrollo de la enfermedad el cual se basa en la realización de podas, regulación de sombrero permanente, sistemas de drenaje, control de malezas, remoción de frutos y tejidos enfermos, cosecha oportuna, fertilización (39).

##### **2.2.4.2. Control químico.**

El uso de fungicidas ha sido sugerido para controlar la moniliasis del cacao en diversos lugares, sin embargo en la mayoría de los casos se considera que son poco efectivos además de los altos costos (39).

Sin embargo para el control de la Monilla, se han empleado productos protectantes, los cuales han mostrado una eficiencia limitada, no obstante se han venido enriqueciendo con sulfato de cobre en dosis de 2 kg/ha y protectantes orgánicos, lo que muestra reducción en la incidencia de la enfermedad (45).

Pero estos productos deben ser aplicados en cultivos con alta densidad y semanalmente durante un periodo de tres meses cuando se ha iniciado los picos más altos de floración (46), por otro lado los fungicidas sistémicos pueden mejorar la eficiencia en el control de *M. royeri*, pero incrementan los costos de producción en el cultivo (47).

En cultivos de alto rendimiento las aplicaciones de Bayleton en dosis de 60 ml/bomba han mostrado buenos resultados para el control de este patógeno (48), No obstante (49) indica que para el manejo de epidemias, actualmente se recomienda aplicar Azoxystrobin en dosis de (250 g/ha, de ingrediente activo) en los frutos con menos de dos meses de edad y posteriormente a esto, asperjar el cultivo con hidróxido cúprico (1500 g/ha) distribuidos durante tres meses para reducir la incidencia de la enfermedad.

#### **2.2.4.3. Control biológico.**

Este control se basa en la implementación de organismos vivos (microorganismos) como herramientas base en la erradicación o reducción del inóculo de un patógeno. Se emplean organismos antagonistas nativos para la inhibición del crecimiento del patógeno (50).

Este tipo de control debe ser utilizado conjuntamente con otros métodos (51). En Perú por ejemplo, se encontraron resultados promisorios utilizando una combinación de *Trichoderma sp.*, *Clonostachys rosea* y *C. byssicola* para controlar *M. royeri* (52). En cambio en el país de Colombia se reportan inhibiciones hasta de 95% en el crecimiento bajo condiciones de laboratorio de *M. royeri* con diferentes cepas controladoras de crecimiento como *Trichoderma sp.* (53).

También implica el empleo de enmiendas que potencien los microorganismos antagonistas nativos presentes en condiciones naturales. Como en el caso de los microorganismos antagonistas que actúan inhibiendo el crecimiento del patógeno ya sea por producción de antibióticos o toxinas y mediante el parasitismo de las estructuras del patógeno directamente. Otra forma de actuar de estos microorganismos es la competencia por espacio o nutrientes, lo cual también limita el crecimiento del patógeno (50).

#### **2.2.4.4. Control genético.**

El control de enfermedades fúngicas utilizando clones resistentes es, sin duda, la alternativa más atractiva y oportuna para los agricultores, pues a través de este método se reducen drásticamente los costos de producción del cultivo y se favorece el medio ambiente por la acción no contaminante (54,55).

Este consiste en implicar la identificación y selección de materiales vegetales o plantas con cierto grado de resistencia a la enfermedad, ya sea que esta resistencia se haya adquirido por selección natural o ingeniería genética. La resistencia, al igual que otras características, pueden ser cuantitativas o cualitativas pues la selección de los materiales se debe realizar de acuerdo con la resistencia cuantitativa, definida como una resistencia que varía entre varios fenotipos de una población de plantas, la cual puede ir desde imperceptible (solo una leve reducción del crecimiento del patógeno) a muy fuerte (poco crecimiento del patógeno) (43).

No obstante hasta la fecha se han desarrollado muy pocos genotipos altamente resistentes a las infecciones, lo que indica que gran parte de la población vegetal actual contiene genotipos débiles, altamente vulnerables a infecciones por patógenos (50,56). Y para minimizar este riesgo, dependiendo del sitio de cultivo, es necesario seleccionar clones de cacao adecuados con la zona o lugar en que se desea hacer la referencia.

#### **2.2.5. Prácticas para manejo de Monilla.**

Se incluyen a continuación algunas prácticas sobre el manejo que deberían ser tomadas en cuenta de sus cultivos con el fin de reducir la incidencia de la enfermedad (57):

- Mantener una altura de plantas menor que 3,5 m.
- Realizar podas de mantenimiento al principio de los periodos secos.
- Retirar del árbol los frutos con síntomas iniciales de la enfermedad, tales como protuberancias aceitosas y manchas características.
- En los meses de mayor fructificación revisar semanalmente la plantación, removiendo frutos con síntomas de infección.
- En las demás épocas del año esta labor debe ser realizada cada dos semanas.

- Los frutos con síntomas avanzados de la enfermedad deben permanecer sobre el suelo en el sitio donde caigan y preferiblemente cubrirlos con arvenses u hojarasca. Algunos agricultores recomiendan adicionar caliza sobre estos desechos.
- En plantaciones jóvenes, donde la enfermedad se detecte por primera vez, es aconsejable remo-ver y enterrar los frutos.
- En zonas boscosas, húmedas, bajas y cálidas es conveniente esta-blecer plantaciones híbridas o clones con alto grado de resistencia.
- En cultivos comerciales o en sitios con limitaciones de mano de obra, se recomienda hacer aplicaciones de productos que contengan cobre como ingrediente activo, iniciando en los periodos de mayor floración y formación de frutos.
- Fomentar las rondas fitosanitarias en días determinados, con el fin de evitar contaminaciones por dispersión del patógeno en cultivos en diferentes fincas y localidades.

#### **2.2.6. Extractos vegetales.**

En condiciones *in vitro* los extractos vegetales inhiben el crecimiento del patógeno, así como la esporulación y germinación de sus esporas, de modo que ayudan a controlar las enfermedades de frutos y hortalizas, sin embargo *In vivo*, el efecto fungicida de los extractos vegetales varía en función de la metodología de preparación del extracto (solvente, seco, fresco, tiempo de almacenamiento, etc.), especie botánica, órgano de la planta (raíces, hojas, semillas, etc.), fecha de cosecha, etc. De modo que la combinación de los extractos vegetales con algún otro compuesto natural puede potenciar su actividad fungicida, por ende a la fecha son escasos los estudios básicos que incluyen el efecto de extractos vegetales en aspectos moleculares, bioquímicos y morfológicos del hospedero y del patógeno (58).

Este mecanismo de acción es una herramienta útil para el control de plagas y enfermedades, pues tienen un alto potencial para manejar los principales problemas fitosanitarios de la producción agrícola (59). Como parte de acción de su metabolismo, las plantas sintetizan componentes denominados como metabolitos secundarios, estas propiedades químicas se han investigado ampliamente desde mediados del siglo XIX (60,61).

### **2.2.7. .Control de monilla mediante el uso de extractos vegetales.**

En la actualidad, se ha incrementado gradualmente la investigación en la búsqueda de alternativas para el manejo integral de plagas y enfermedades producidas por fitopatógenos, dado que el uso de plaguicidas químicos es la causa principal del deterioro del medio ambiente. Ante esta situación se busca reducir el uso de plaguicidas sintéticos en la agricultura mediante el uso y aplicación de sustancias naturales para el control de fitopatógenos (38).

La importancia de las plantas, se debe a que contienen principios activos en algunos de sus órganos, los cuales, extraídos en forma adecuada y administrados en dosis suficiente, producen efectos curativos que permiten el manejo de microorganismos fitopatógenos y de insectos. El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre los seres vivos. Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.). Otros componentes activos de las plantas son alcaloides, lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas. Los productos naturales pueden ser explorados en varias vías en el desarrollo de nuevos fungicidas para la agricultura. Los extractos pueden ser usados como un extracto crudo para la aplicación directa a los cultivos. (62).

### **2.2.8. Oreganón (*Plectranthus amboinicus*).**

El Oreganón (*Plectranthus amboinicus*), es una planta herbácea perenne, robusta de hojas carnosas y muy olorosas, cuyo aroma se asemeja mucho al del orégano común, este ejemplar posee algunos nombres comunes en diversos países (orégano francés, menta mexicana, orégano indio, orégano brujo, etc.), esta planta pertenece al orden Lamiales, familia Lamiaceae; originarios de las regiones tropicales de Asia Oriental y el Sureste de África (63).

### 2.2.8.1. Clasificación Taxonómica.

**Tabla 2.** *Taxonomía del oreganón.*

---

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	Plecthrenthus
Especie	Amboinicus

---

FUENTE: ÁVILA (64)

### 2.2.8.2. Generalidades.

En la cocina Ecuatoriana, el oreganón es muy utilizado como condimento debido a su agradable aroma y así mismo esta planta tiene un uso medicinal por los ancestros del país en las generaciones pasadas que se siguen transmitiendo hasta la actualidad, pues se trata de una planta herbácea, perenne, su altura máxima puede ser de hasta un metro, sus ramas son muy frágiles y sus hojas anchas, gruesas que tienen una forma ovalada y vellosas (65).

### 2.2.8.3. Composición química.

El compuesto químico en aceite esenciales basados en estudios investigativos, se observa que posee una mayor cantidad al carvacrol, alrededor del 50,07% en especies cultivadas de Cuba, de igual manera tiene compuestos aromáticos y oxigenados (66).

Esta planta en la India, sus compuestas químicos principales son carvacrol (28,65%), seguido de timol (21,66%),  $\alpha$ -humuleno (9,67%), undecanal (8,29%),  $\gamma$ -terpineno (7,76%),  $\rho$ -cimeno (6,46%), óxido de cariofileno (5,85%),  $\alpha$ -terpineol (3,28%) y  $\beta$ -selineno (2,01%) (67).

Los aceites esenciales han sido identificados como metabolitos secundarios de las plantas, así se ha relacionado al metabolismo activo de la planta con la cantidad de aceite que contiene (68), es decir que mientras sea mayor el metabolismo, mayor será la producción de aceite esencial. Generalmente se han encontrado en los aceites esenciales hidrocarburos

alicíclicos y aromáticos; así como también derivados oxigenados como son aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas; sustancias nitrogenadas y azufradas.

#### **2.2.8.4. Mecanismo de acción.**

El mecanismo de acción del aceite esencial de orégano frente a los microorganismos, está entre las sustancias presentes en el aceite, pues es en este en donde se encuentran diversos compuestos fenólicos como es el timol y carvacrol, que poseen actividad antimicótica y antibacteriana. Aunque no es factible decir que su actividad antimicrobiana puede ser atribuida a solo un mecanismo específico, existen puntos claves donde estos compuestos hagan efecto, entre estos puntos tenemos daño a la membrana citoplasmática, daño a la pared celular, daño a las proteínas, coagulación del citoplasma, filtración del contenido celular (69).

#### **2.2.8.5. Método de extracción.**

Los aceites esenciales se aíslan de la planta entera o de algunas partes específicas, como son las flores, semillas, brotes, ramas, hojas, corteza, raíces, y frutos por varios métodos; así tenemos: destilación de componentes por vapor, fermentación, extracción supercrítica, compresión a presión, extracción por disolventes orgánicos fácilmente volátiles o fitosoles (70).

#### **2.2.9. Jengibre (*Zingiber officinale* L.).**

Esta planta herbácea perteneciente a la familia de las zingiberáceas, perenne, rizomatosa, crece hasta un metro de altura. Es de tallos simples con hojas lanceoladas, oblongas, dispuestas a lo largo del tallo en dos líneas paralelas. Sus flores son sencibles amarillas y labios purpúreos reunidas en una espiga densa al extremo del tallo. Fruto seco y valvoso, la parte que se utiliza es el rizoma. Es originario del sudeste asiático, ha sido cultivada desde hace 3000 años, su nombre original es “sringavera” es un vocablo sánscrito que significa cuerpo (*vera*) en forma de cuerno (*sringa*), pasó al persa como “dzungebir” y ya en español como “jengibre” (71).

### 2.2.9.1. Clasificación taxonómica.

**Tabla 3.** *Taxonomía del jengibre.*

Reino	Plantae
Familia	Zingiberaceae
Género	Jengibre
Especie	Officinalis
Nombre científico	<i>Zingiber Officinale</i>

FUENTE: BORJA, CHIMBO (72).

### 2.2.9.2. Principio activo.

Son aceites esenciales (0,3-3,3%). Con zingibereno, dextrcamfeno, metilheptenona, pinol, linalol, geraniol, citral, borneol, bisaboleno, farneseno, curcumeno, zingiberol (responsable de su olor) y aldehídos decílicos y nonílicos. Resina (5-8%). A ella se debe gran parte de su sabor picante ya que contiene compuestos fenólicos como el gingerol (0,6-1,4%) y shogaol o zingiberona (71).

### 2.2.10. Ortiga (*Urtica dioica*).

Hierba perenne, con tallos postrados, delgados y persistentes (similares a rizomas), que producen cada año ramas aéreas verticales de hasta 1,5 m de altura. Hojas opuestas, pecioladas, ovado-lanceoladas, de margen serrado y con estípulas. Las flores aparecen en inflorescencias ramificadas que cuelgan de los nudos superiores. Individualmente son pequeñas y poco llamativas, tienen un perianto monoclamídeo de cuatro piezas de color verde y cuatro estambres (masculinas) o el giniceo (las femeninas). El fruto es pequeño, florece en primavera y verano (73).

**Tabla 4.** *Taxonomía de la ortiga.*

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Urticaceae
Género	Urtica

FUENTE: HUERTA (74).

### **2.2.10.1.Principio activo.**

Esta planta brinda muchos beneficios debido a sus componentes como son:

- Flavonoides (0,7-1,8%). Rutina, isoquercitrina(0,2%), quercetina, kenferol, isoramnetina, astragatina.
- Aceite esencial: cetonas(38,5%); ésteres (14,7); alcoholes libres (2%).
- Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico: Ácido clorogénico, cafeico, cafeimático.
- Taninos.
- Ácidos orgánicos: Ácido acético, butírico, cítrico, fórmico, fumárico.
- Sales minerales (20%): hierro, azufre, manganesio.
- Carotenos.
- Esteroides.
- Aminas.
- Alcaloides.
- Vitaminas (74).

**CAPÍTULO III**  
**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.**

### **3.1. Localización.**

La presente investigación se realizó en la Finca Experimental La María en el Laboratorio de Rumiología en el área de Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo ubicada en el Km 7½ vía Quevedo – El Empalme a una altura entre 75 y 80 msnm; longitud 79°29' O y latitud S 1°06; clima tropical húmedo, la temperatura máxima es de 32 °C y la mínima es de 22 °C con precipitaciones anuales de 2000 a 3000 mm y heliofanía anual de 870 horas luz/año, este trabajo de investigación tuvo una duración de 40 días.

### **3.2. Tipo de investigación.**

La investigación propuesta es de tipo exploratoria por medio las variables y el objetivo general para evaluar el uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control *in vitro* de la monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) en la Finca Experimental La María en el Laboratorio de Rumiología en el área de Microbiología, que contó con los equipos y materiales necesarios para el desarrollo de la investigación.

El presente trabajo investigativo fue un referente para los futuros estudios a realizar, indagaciones de forma más amplia de las innovaciones en las nuevas alternativas en el control de la Monilla en *T. cacao* y que justifique el costo de producción.

### **3.3. Métodos de investigación.**

Uno de los métodos a emplear en la investigación actual fue de observación, se registró el crecimiento radial del hongo cada 24 horas, contaminación de las mismas sembradas en las cajas Petri que contenían el medio PDA.

Se usó el método experimental pudimos estudiar cada variable dependiente, la cual nos ayudó a determinar el mejor tratamiento y el mejor método de extracción con la utilización del análisis de varianza Tukey.

### 3.4. Fuente de recopilación de información.

La información recopilada en la investigación se la obtuvo de fuentes primarias a través de la observación directa del hongo *Moniliophthora roreri* Cif & Par en Laboratorio y fuentes secundarias tales como artículos científicos, documentos de tesis, libros entre otros.

### 3.5. Diseño de la investigación.

En el experimento se empleó un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo agregado 3\*2+1 (tres especies vegetales, dos métodos de extracción más un testigo PDA) con cuatro repeticiones los cuales se detallan a continuación.

**Tabla 5.** Descripción de los tratamientos.

Trat.	Factor		R	U.E	Total U.E
	Métodos A	Extractos B			
1	S/N	PDA	4	1	4
2	Infusión	Jengibre	4	1	4
3	Infusión	Oreganón	4	1	4
4	Infusión	Ortiga	4	1	4
5	Maceración	Jengibre	4	1	4
6	Maceración	Oreganón	4	1	4
7	Maceración	Ortiga	4	1	4
Total					28

\*R= repetición, UE= Unidad experimental, Elaborado: Autor.

Para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos se empleó la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Tabla 6.** Esquema de Análisis de Varianza

Fuente de Variación	Grados de libertad	
Tratamientos	t-1	6
Métodos de Extracción (ME)	a-1	1
Extractos Vegetales (EV)	b-1	2
INT. EV*ME		2
Testigo vs Todo	(a-1)(b-1)	1
Error experimental	t (r-1)	21
Total	t*r-1	27

El modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_j + \beta_k + (\alpha * \beta)_{jk} + E_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = Puntuación en variable dependiente  $Y$  del sujeto para la combinación de tratamientos  $i$  y  $j$

$\mu$  = Es el efecto de la media por observación

$\alpha_i$  = Efecto del factor A

$\beta_k$  = Efecto del factor B

$(\alpha * \beta)$  = Efecto de la interacción A\*B

$E_{ij}$  = Un elemento al azar (error experimental).

### 3.6. Instrumento de investigación.

Entre los instrumentos utilizados en la investigación está la observación directa, síntesis y registro de datos de las variables que fueron evaluadas en laboratorio para luego ser plasmadas en los resultados.

### 3.7. Variables evaluadas.

#### 3.7.1. Crecimiento radial del hongo.

Para la medición del crecimiento radial del hongo se lo realizó en las cajas Petri donde se efectuó la siembra del patógeno en el PDA con la contaminación de los extractos, para

esta medición se utilizó un calibrador y los datos fueron tomados en mL cada 24 horas en un horario de 14:00 a 15:00 pm por un lapso de siete días, tiempo en el cual el hongo invadió la caja Petri.

### **3.7.2. Porcentaje de inhibición.**

El registro de este dato se tomó al séptimo día (168 horas) de haberse realizado la siembra del hongo, para la obtención de los datos se utilizó un calibrador el cual nos permitió tomar las mediciones en milímetros.

## **3.8. Manejo del experimento.**

### **3.8.1. Recolección del hongo.**

Se recolectaron frutos maduros contaminados que presentaron síntomas característicos del patógeno como el crecimiento micelial del hongo en la cobertura de la mazorca.

### **3.8.2. Preparación del medio PDA y esterilización de los materiales a utilizar en el trabajo.**

Para la preparación del medio de cultivo se lo realizó pesando 40g de PDA por 1000 mL de agua, lo mezclamos en un agitador calentador para que se vaya agitando hasta llegar al punto de ebullición en un lapso de 40 a 60 minutos, se realiza la prueba de solidificación y se esteriliza en autoclave por 30 minutos a 15 psi. Se relializó el llenado de las cajas Petri con 15 mL por cada una y se deja solidificar por 30 minutos.

De la misma manera se esterilizaron en autoclave por 30 munitos a 15 psi las cajas petri, matraz, vaso de precipitación, saca bocado y azas.

### **3.8.3. Aislamiento del hongo en laboratorio.**

Se preparó el medio de cultivo PDA en la cajas Petri para realizar la siembra que se la realizó en la cámara de bioseguridad, donde se realizaron cortes de 1cm<sup>2</sup> aproximadamente y se desinfecto el material vegetativo usando alcohol al 70%, cloro y agua destilada, luego de realizo la siembra ubicando cuatro cortes por cada caja las cuales fueron envueltas en papel film y se incubaron en estufa a una temperatura de 30.5°C por 10 días donde el hongo alcanzó a cubrir toda la caja Petri.

Posterior a esto se realizó repique con el fin de obtener el hongo más puro, en el cual se preparó un nuevo medio de cultivo PDA en las cajas Petri para realizar la siembra en la cámara de bioseguridad, para esto se obtuvieron bocados de 4mm del micelio del hongo que fue previamente sembrado y se ubicó en la mitad de cada caja de petri que obtenía el medio de cultivo PDA. Una vez realizada la siembra en las nuevas cajas fueron selladas con papel film y llevadas a una estufa con temperatura de 30.5 °C por 10 días donde el hongo invadió la caja Petri.

### **3.8.4. Selección y recolección de las especies vegetales (Origanón, Jengibre y Ortiga).**

Fueron seleccionadas tres especies vegetales con propiedades anti-fúngicas, para esto se realizaron investigaciones referentes al tema. De esta forma se seleccionaron las especies indicadas en la siguiente tabla.

**Tabla 7.** *Especies vegetales seleccionadas.*

<b>N°</b>	<b>Nombre vulgar</b>	<b>Nombre científico</b>
1	Origanón	<i>Plectranthus amboinicus</i>
2	Jengibre	<i>Zingiber officinale</i> L.
3	Ortiga	<i>Urtica dioica</i>

Una vez seleccionadas las especies vegetales se realizó la recolección de estas que fueron encontradas en jardines medicinales que tienen las familias rurales y en huertas viejas que han dejado de ser trabajadas por un largo tiempo.

### **3.8.5. Preparación de los extractos vegetales.**

Para la preparación de los extractos se lavó el material vegetativo con agua corriente, seguido de cloro y un enjuague con agua estéril. Tanto para la preparación en infusión como para maceración se utilizó 250 g. de material vegetal por 2,5 litros de agua, esta fue considerada solución madre.

### **3.8.5.1. Infusión**

Se realizaron los cortes de 1 cm de cada especie previamente desinfectados, se colocaron en un matraz de 1000 mL al cual se vertió agua hirviendo a 100 °C, se procedió a tapar y dejar reposar por 24 horas.

### **3.8.5.2. Maceración**

Al igual que el método de infusión se realizaron los cortes de cada especie previamente desinfectados, se colocaron en un recipiente para triturarlos con un mortero y luego colocarlos en un matraz de 1000 mL, y en este caso se vertió agua estéril a temperatura ambiente, se tapó y se dejó reposar por 24 horas.

### **3.8.6. Siembra del patógeno en las cajas que contienen extracto más PDA.**

Se procedió a preparar el medio de cultivo mezclando el PDA más la solución madre de cada extracto (30 mL de agua más PDA y 30 mL de extracto), teniendo una dosis del 50% y un volumen de 60 mL en cada tratamiento el cual nos sirvió para el llenado de 4 cajas por tratamiento, cada una contiene 15 mL de extracto al 50%.

Una vez que se obtuvo el hongo en estado puro y haber preparado los extractos más el medio PDA se procede a la siembra en la cabina de bioseguridad previamente desinfectada utilizando un saca bocado de 4 mm realizamos la siembra en las cajas Petri que contienen el medio PDA más los extractos los cuales ya se encuentran solidificados, se realizó el sellado con papel film y por último se pasaron las cajas Petri a incubación a 30,5 °C en una estufa previamente desinfectada. Luego se procedió al registro de datos cada 24 horas por siete días utilizando un calibrador.

### **3.9. Tratamiento de los datos.**

El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza ANOVA y las medidas fueron comparadas mediante la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), con la utilización del paquete estadístico de software libre, cuadros, figuras y el procedimiento de los datos se efectuó en Excel del paquete Office de Microsoft.

### **3.10. Recursos humanos y materiales.**

En la presente investigación se obtuvo la contribución de talentos humanos como:

- Director del proyecto de investigación Ing. Quintana Zamora Jorge Gustavo, Coordinador del Laboratorio de Rumiología Ing. David Zapatier y el autor Kevin Freire Segura.

Para desarrollar la investigación se usó de materiales y equipos, los mismos que detallan en el enunciado posterior.

#### **3.10.1. Materiales de laboratorio.**

- Cabina de seguridad
- Balanza
- Autoclave
- Estufa
- Guantes
- Caja Petri
- Mascarilla
- Probeta
- Matraz
- Vaso de precipitación
- Azas
- Mechero
- Papel film
- Calibrador
- PDA
- Hipoclorito de sodio
- Extracto de jengibre
- Extracto de oreganón
- Extracto de ortiga
- Mazorca de cacao con monilla

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

## 4.1. Resultados y discusión.

En este capítulo se muestran los resultados del crecimiento radial del hongo (*Moniliophthora rorrii* Cif & Par) y porcentaje de inhibición del mismo mediante el uso de extractos vegetales para el control *in vitro* de monilla.

### 4.1.1. Crecimiento radial de hongo.

Con respecto al crecimiento radial del hongo (*Moniliophthora rorrii* Cif & Par), se indica el

**Tabla 8.** Efecto de métodos de extracción para el control *in vitro* de monilla sobre el crecimiento radial del hongo.

H.C	Crecimiento radial (mm)	
	Infusión	Maceración
48 horas	4,57 a	4,67 a
72 horas	6,50 a	7,67 a
96 horas	8,33 b	11,83 a
120 horas	13,00 b	16,83 a
144 horas	15,83 b	21,50 a
168 horas	18,67 b	24,25 a

H.C = Hora de crecimiento; Promedios con letras iguales en cada fila difieren estadísticamente, según Tukey ( $p < 0,05$ ).

En la tabla ocho, se observa que existió significancia estadística ( $p < 0,05$ ) en los métodos de extracción (infusión y maceración) a partir de las 96 a 168 horas de crecimiento sobre el control *in vitro* de monilla, donde el mayor crecimiento radial del hongo en términos generales lo presentó el método de maceración, siendo este efecto mayor a las 168 horas con 24,25 mm, mientras que el menor crecimiento del hongo se vio reflejado sobre el método de infusión con 8,33 mm durante las 96 horas de haber sido sembrado el hongo de monilla.

Para Joya *et al.*, (75), el método de extracción mediante hidrolización de jengibre fue el que obtuvo un menor crecimiento micelial y producción de conidias del patógeno

(*Moniliophthora roreri* Cif & Par) a la 96 horas de haberse inoculado con un valor de  $44,4 \times 10^4$  conidias  $\text{ml}^{-1}$ .

Según García *et al.*,(76), al realizar la evaluación de la actividad anti fúngica con los aceites esenciales obtenidos en plantas aromáticas, mediante destilación determinaron una mayor actividad biológica con limonaria (*Cymbopogum citratus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), obteniendo los mejores porcentajes de inhibición alrededor del 74,98%.

En la siguiente tabla nueve, se detalla el efecto de los extractos vegetales (Factor B) sobre el crecimiento radial del hongo para el control *in vitro* de monilla.

**Tabla 9.** Efecto de los extractos vegetales en el crecimiento radial de la monilla

H.C	Crecimiento radial (mm)		
	Jengibre	Oreganón	Ortiga
48 horas	6,13 a	5,38 a	2,38 b
72 horas	9,38 a	8,50 a	3,38 b
96 horas	13,00 a	12,13 a	4,38 b
120 horas	18,13 a	18,63 a	8,00 b
144 horas	23,00 a	23,75 a	9,25 b
168 horas	25,63 a	23,00 a	12,75 b

H.C = Hora de crecimiento; Promedios con letras iguales en cada fila difieren estadísticamente, según Tukey ( $p < 0,05$ ).

La presente tabla indica que existió alta significancia estadística ( $p > 0,01$ ) en los extractos vegetales de jengibre, oreganón y ortiga sobre el control *in vitro* de monilla durante el tiempo evaluado (48-168 horas), donde el menor crecimiento radial del hongo se fluctuó sobre el extracto de ortiga con 12,75 mm a las 168 horas de siembra, ya que las variaciones en su crecimiento fueron lentas en el transcurso del tiempo, mientras que los mayores crecimientos del hongo de monilla lo presentaron el extracto de jengibre y Oreganón.

Sin embargo Pereira *et al.*,(77) indican que en *Lactarius deliciosus* como en hongos de su especie, presentan comportamientos diferente de crecimiento radial en medios de cultivo, observando así que la mayor velocidad de crecimiento se logra en el medio de cultivo BAF

(1,35 mm día), mientras que el menor desarrollo se presenta en el medio de cultivo PDA (0,21 mm día), produciéndose diferencias significativas entre el crecimiento.

Por otro lado Puente *et al.*, (78) muestran que el efecto del extracto vegetal de *Phyla strigulosa* var. *sericea*, sobre el hongo fitopatógeno del suelo *Sclerotium rolfsii* Sacc., causante de pudriciones en el cuello y la raíz de plántulas de cultivos susceptibles, al evaluarse el efecto de estos extractos al 50% de concentración estos extractos mostraron actividad inhibitoria y crecimiento micelial frente a este hongo fitopatógenos.

En la tabla 10, se muestra la interacción de los tratamientos sobre el crecimiento radial del hongo, para el control *in vitro* de monilla, donde se observa que existió significancia estadística ( $p < 0,05$ ) para el Factor A (Métodos de extracción) a partir de las 96 horas, no obstante el Factor B (Extractos vegetales) presento significancia altamente estadística ( $p > 0,01$ ) desde las 72 horas posteriores a la siembra del hongo, reflejando así la significancia de la interacción de los tratamientos evaluados.

Todos los tratamientos crecieron de forma considerable, a excepción del T1 (Testigo) quien fue el que revelo los valores más altos sobre el crecimiento de hongo durante el tiempo de investigación, reflejando así diferencias notables con el resto de tratamientos en los que se aplicó diferentes tipos de métodos y extractos vegetales, donde la ortiga tanto en maceración como infusión generaron un menor crecimiento radial del hongo.

**Tabla 10.** Interacción de los tratamientos evaluados sobre el crecimiento radial del hongo.

Crecimiento radial (mm)							
H.C	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
48 h	7,25 a	6,50 a	4,50 abc	2,75 bc	5,75 ab	6,25 ab	2,00 c
72 h	13,25 a	9,75 ab	5,75 cd	4,00 d	9,00 bc	11,25 ab	2,75 d
96 h	20,50 a	13,25 b	7,00 c	4,75 c	12,75 b	17,25 ab	4,00 c
120 h	22,75 ab	19,25 ab	11,50 cd	8,25 d	17,00 bc	25,75 a	7,75 d
144 h	40,50 a	24,25 bc	13,50 de	9,75 e	21,75 cd	34,00 ab	8,75 e
168 h	46,50 a	26,75 bc	16,25 cd	13,00 d	24,50 c	35,75 b	12,50 d

H.C = Hora de crecimiento; T1 = Testigo (Sin método y extracto); T2 = Infusión de jengibre; T3 = Infusión de oreganón; T4 = Infusión de ortiga; T5 = Maceración de jengibre; T6 = Maceración de oreganón; T7 = Maceración de ortiga; Promedios con letras iguales en cada fila difieren estadísticamente, según Tukey ( $p < 0,05$ ).

Los datos obtenidos del testigo son superiores a lo dicho por Sánchez, (79), quien encontró que *M. roreri* a los cuatro días (96 horas) de incubación presentó un diámetro de crecimiento de 3,7 mm, además según Villamil *et al.*, (80) indican que la velocidad de crecimiento de los aislamientos bajo PDA fue de 2,8 mm cada tres días de incubación, suficiente para cubrir toda la superficie de la caja Petri, a los 48 días, no concordando con los valores de crecimiento del testigo en evaluación.

Las variaciones existentes en el crecimiento radial del hongo se asemeja a lo descrito por Sangeetha, (81), quien menciona que la mayoría de los extractos derivados de especies vegetales produce una reducción en la velocidad de crecimiento de patógeno, afectando a la membrana celular del patógeno y reduciendo más del 50% el crecimiento micelial de patógenos.

Por otro lado Silva *et al.*,(82) indican que al realizar extractos de ajo y cebolla, la inhibición del crecimiento del hongo se detuvo paulatinamente, así como con el extracto de mamón contra *Colletotrichum sp*, ya que el extracto de ajo tuvo efecto inhibitor sobre siete especies de hongos (*Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Pythium sp.*) mientras que el efecto de la cebolla obtuvo una menor intensidad y afectó solo a *Fusarium sp.*, *Alternaria sp.*, *Colletotrichum sp.* y *Pythium sp.*

#### 4.1.2. Porcentaje de inhibición.

En cuanto al porcentaje de inhibición del hongo (*Moniliophthora roreri* Cif & Par), se indica el efecto del factor (A) métodos de extracción para el control *in vitro* de monilla.

**Tabla 11.** Efecto del método de extracción (Factor A) sobre el porcentaje de inhibición a las 168 horas para el control *in vitro* de monilla.

Método de extracción (%)	
Infusión	Maceración
76,69 a	69,70 b

Promedios con letras iguales en cada fila difieren estadísticamente, según Tukey (p<0,05).

En la presente tabla 11, el análisis de varianza indica significancia estadística para el porcentaje de inhibición en los métodos de extracción (maceración e infusión) sobre el control de monilla, reflejando así que el método de extracción mediante infusión fue el que mejor inhibió el crecimiento del hongo en el transcurso del tiempo evaluado con un valor de 76,69% obteniendo una diferencia del 7% con el método de maceración.

En cambio Scalvenzi *et al.*, (83) señalaron que al realizar extracción de aceites esenciales, a partir de hojas frescas de canela y matico, mediante destilación por arrastre de vapor, observaron que el aceite esencial de *O. quixos*, a la concentración de  $500 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ , inhibió el crecimiento de todas las cepas fitopatógenas, alcanzando porcentajes del 89% (*C. cladosporioides*), del 94% (*M. roreri*) y del 95% (*A. oryzae*, *F. solani*, *Phytophthora* sp., *R. stolonifer*) a los diez días de ser sembrados.

Por otro lado, Gamboa *et al.*, (84) indican que mediante extracción de hojasén (*F. cernua*), mejorana (*O. majorana*) y trompetilla (*B. ternifolia*), muestran un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Rhizotocnia. solani* desde la dosis de 4000 a 20000 ppm, logrando así inhibir hasta en un 86,2% con el extracto de *F. cernua* y que el efecto fungistático de este patógeno se conservó a las 96 h con el extracto de *F. cernua* y *B. ternifolia* a la mayor dosis con tan sólo un 67,2 y 34,9%, respectivamente.

**Tabla 12.** Efecto de extractos vegetales (Factor B) sobre el porcentaje de inhibición a las 168 horas para el control *in vitro* de monilla.

Pocentaje de inhibición (%)		
Jengibre	Oreganón	Ortiga
67,99b	67,51b	84,09a

Promedios con letras iguales en cada fila difieren estadísticamente, según Tukey ( $p < 0,05$ ).

En la tabla 12, se indica el efecto del factor en estudio el cual presentó alta significancia estadística ( $p > 0,01$ ) para los extractos vegetales (B), siendo el extracto vegetal de ortiga el que refleje el valor más alto con relación a porcentaje de inhibición obteniendo un valor del 84,09%, mientras que para los extractos de jengibre y Oreganón fluctúen con un  $67 \pm 0,75$  % durante las 168 horas evaluadas.

No obstante Rodríguez y Osorio, (85) revelan que en ensayos de plato dual encontraron los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento radial del fitopatógeno (*Moniliophthora roreri*), mediante incubación con *Trichoderma* (51%), *Gliocladium* (48,2%), *Lecanicillium* (*Verticillium*) (31,42%), y *Paecilomyces* (34,28%) respectivamente.

Según Sacchetti *et al.*, (86), indican que el jengibre tiene un efecto inhibitor en su aceite a concentraciones altas, mostrando presencia de fenilpropanoides, compuestos que le dan propiedades de control sobre levaduras como *C. albicans*, *R. glutinis*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Y. lypolitica*.

**Tabla 13.** Interacción de los tratamientos evaluados sobre el porcentaje de inhibición que presentaron los métodos y extractos sobre el control *in vitro* de monilla.

Porcentaje de inhibición							
% I.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	41,90 d	66,58 bc	79,70 ab	83,80 a	69,40 b	55,33 cd	84,38 a

% I = Porcentaje de inhibición; T1 = Testigo (Sin método y extracto); T2 = Infusión de jengibre; T3 = Infusión de oreganón; T4 = Infusión de ortiga; T5 = Maceración de jengibre; T6 = Maceración de oreganón; T7 = Maceración de ortiga; Promedios con letras iguales en cada fila difieren estadísticamente, según Tukey ( $p < 0,05$ ).

En la tabla 13, el análisis de varianza para la variable porcentaje de inhibición presento diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) para el factor A (métodos de extracción y alta significancia estadística ( $p < 0,01$ ) para extractos vegetales (Factor B) como para su interacción, siendo el T7 (maceración ortiga) y T4 los que presentaron el mayor porcentaje de inhibición con 84,38 y 83,80%, diferenciándose considerablemente del T1 (Testigo) ya que fue este el que presentó el menor porcentaje de inhibición con 41,90 %.

El alto porcentaje de inhibición obtenido mediante el extracto de ortiga indica se asemeja a lo descritos por Quisi, (87) quien señala que el modo de acción se debe a la presencia de ciertos principios activos que contienen las hojas como quinonas, taninos y flavonoides, y son estos compuestos secundario biológicamente los que se activan con propiedades fungistáticas.

No obstante Joya *et al.*, (75), revela que el tratamiento J5 (jengibre seco, 45 g/L) fue el mejor hidrodestilado de los ocho evaluados, pues este presentó los mejores niveles de

control en la formación y germinación de conidias de *M. royeri* en cacao con valor del 74% durante el transcurso del tiempo evaluado en su investigación.

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**

## 5.1. Conclusiones.

- ✓ Al analizar el uso de dos métodos de extracción se concluye que el método de maceración a base del extracto de Ortiga (*Urtica dioica*) presentó ser más eficiente en el control *in vitro* de monilla (*Moniliophthora rorreri* Cif & Par).
- ✓ El T7 (Maceración de Ortiga) predominó de los demás tratamientos al presentar el menor crecimiento radial del hongo, de la misma forma se vio reflejado sobre este tratamiento el mayor porcentaje de inhibición del hongo sobre el control fúngico de la monilla.

## **5.2. Recomendaciones.**

Se recomienda utilizar en futuros experimentos el método de maceración a base de Ortiga (*Urtica dioica*) en dosis mayores al 50% en plantaciones de cacao Nacional y Trinitario, ya que presentó mayor eficiencia sobre el control in vitro de monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par).

De acuerdo al menor crecimiento radial de *M. roreri* y mayor porcentaje de inhibición del mismo, que presentó el T7 (Maceración Ortiga) se recomienda la utilización de este extracto en el campo para comprobar su eficiencia.

## **CAPÍTULO VI**

### **BIBLIOGRAFÍA.**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez-Mora F, Garcés F, Vera J, Ramos R, Troya F, T D. Cuantificación de enfermedades en mazorcas de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona central del Litoral Ecuatoriano. In Memorias del VIII Simposio Internacional de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe. Quito – Ecuador; 2011.
2. FAO, MAGAP. Taller Nacional: La denominacion de origen para el cacao "Arriba" del Ecuador: La cadena de valor del cacao en el Ecuador: diagnóstico actual. [Online].; 2010 [cited 2014 mayo 27. Available from: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/Ecuador/ppp/taller%20nacional%20ecuador/2DiagnosticoCadenaCacaoSergioPino.pdf>.
3. Radi C. Estudio sobre los mercados de valor para el cacao Nacional de origen y con certificaciones: CORPEI; 2005.
4. Santander V. Plan de comercio exterior y negociación internacional para exportar cacao en grano “fino y de aroma” desde la parroquia La unión, Esmeraldas hacia Hamburgo, Alemania. Ejercito ESPd, editor. Quito: ESPE; 2010.
5. Philips–Mora. Jefe Programa de Mejoramiento Genético de Cacao. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Apartado 7170 ; 2007.
6. Evans H. Invasive neotropical pathogens of tree crops. *Tropical Mycology* Wallingford, UK: CABI Publishing. 2002; Vol. 2 Micromycetes(83–112).
7. Evans H, Holmes K, Reid A. Phylogeny of the frosty pod rot of cocoa. *Plant Pathology*. 2003; 52(476–85).
8. Rorer J. Ecuador cacao (part 2). *Tropical Agriculture*. 1926; 3(68–9).
9. Enríquez G, Brenes O, Delgado J.. Desarrollo e impacto de la moniliasis del cacao en Costa Rica. Proceedings of the Eighth International Cocoa Research Conference, 1981. Cartagena, Colombia: Cocoa Producers’ Alliance; 1982.
10. Krauss U, Soberanis W. Rehabilitation of diseased cacao fields in Peru through shade

regulation and timing of biocontrol measures. *Agroforestry Systems*. 2001; 53(179–84): p. 53, 179–84.

11. Anon. Duro golpe al cacao: se dañan mil manzanas de cultivo. *La Prensa on the Web* (Honduras). [Online].; 2001 [cited 2017 03 16. Available from: <http://www.laprensahn.com/portadas/0105/p05.htm>.
12. Sanchez, F; Garcés F. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*. 2012 Agosto.
13. Hernandez L, Bautista B, Velázquez V. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades en poscosecha. *Fitotecnia Mexicana*. 2007; 30.
14. Sanabria M, Bolivar K, Rodriguez D, Crecente O, Camacho M, Ulacio D, et al. Potential fungicidal effect of plant extracts on in vitro development of *Colletotrichum gloeosporioides* and on anthracnose of mango. *UDO agricola*. 2009 Jun; 1(9).
15. Delgado A, Suarez C. *Monilla del cacao*. INIAP , editor. Quito: Documento Técnico N°; 1993.
16. Kranz J. The role and scope of mathematical analysis and modeling in epidemiology. In Bertschinger L. *Modeling Plant Virus Disease Epidemics: Development and Use of Simulation Models*. Springer, Berlin; 1997. p. 7-54.
17. Santamaria L, Ureta C. *apsnet*. [Online].; 2004 [cited 2016 12 17. Available from: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicidesSpanish.aspx>.
18. Caldas A. Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido. tesis de grado. Cuenca : Universidad de Cuenca , Ciencias Químicas ; 2012.
19. Inca A. Elaboración de un fitofarmaco semisólido de acción adelgazante con diferentes dosis de alcahofa (*Cynara cardunculus var scolymus*), Jengibre (*Zingiber officinale*) y cascara de naranja (*Citrus sinensis*) administrado a personas para comparar su eficacia. Tesis de grado. Riobamba : Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Bioquímico farmacéutico ; 2012.

20. Quisi R. Estudio comparativo de la actividad hipoglucemiante del extracto de Ortiga (*Urtica dioica*), extracto de Berro (*Nasturtium officinale*), y extracto de Nogal (*Juglans regia*), en ratas (*Rattus norvegicus*), con hiperglucemia inducida. Tesis de grado. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Bioquímica y Farmacia ; 2012.
21. Guerrero L, Núñez M. Obtención de Aceites Esenciales de Eucalipto y Orégano. , Industria Farmacéutica; 1991.
22. Alarcón E. Foro de las América para la Investigación y desarrollo tecnológico (FORAGRO): Un camino hacia su consolidación para la cooperación México: FORAGRO; 2001.
23. Arguello-Navarro A, Moreno-Rozo L. Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótrofes aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta Agronómica. 2014; 63(3): p. 1-12.
24. Leiva E. Aspectos para la nutrición del cacao *Theobroma cacao* L. , Facultad de Ciencias Agrarias; 2015.
25. Aldona H. El Cacao Bogotá-Colombia: Terranova; 1995.
26. INIAP. Manual del cultivo de cacao. Manual No. 25. Segunda. Corregida y Aumentada ed. EET Pichilingue, Quevedo, Ecuador; 1993.
27. Vera B. Material de siembra y propagación. In manual del cultivo de cacao. Segunda ed.: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias; 1993.
28. Decebra J. Manejo y Producción del Cacao CCN-51. Ecuador; 2004.
29. Quiroz, J., Amores, F. Rehabilitación de plantaciones tradicionales de cacao en Ecuador. Ciencia y tecnología. 2002. Enero; 1: p. 73-80.
30. Aranzazu F, Jaimes Y. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en *Monilia* (*Moniliophthora roreri*). Corpoica, Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, In: Hoyos L.M. (ed.); 2010.

31. Grisales S, Afanador L. Análisis de variabilidad genética en *Moniliophtherora roreri* con AP-PCR y RPAD en Antioquia, Colombia. *Biotecnología*. 2007; 2(15-32).
32. Evans HC, Holmes KA, Reid AP. Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathol*. 2003; 52(476 - 485).
33. Evans HC. Cacao Diseases : Important threats to chocolate production worldwide cacao diseases -The Trilogy. *Phytopath*. 2007; 97(1640 - 1643).
34. Albuquerque PSB, Bastos CN, Luz ED, Silva SD. Doenças do cacauero (*Theobroma cacao*). In: Kimati H.; Amorim L.; Rezende J.A.; et al. (eds). *Man. Fitopatol. Piracicaba, Brasil*; 2005. Report No.: 4ta ed. Livrocerec.
35. Johnson J, Bonilla J, Agüero L. *Manual de manejo y producción del cacaoero*. Leon, Nicaragua; 2008.
36. Merchán V. Avances de la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. *El cacaoero Colombiano*. ; 1981.
37. Garcia O, Macedo JAN, Tibúrcio R, Zapparoli G. Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycol. Res*. 2007; 111(443-455): p. 111:443 - 455.
38. Moreta A. Evaluación de la actividad antifúngica en *moniliophthora roreri* de frutos de cacao (*Theobroma cacao* L) de extractos de látex de sande de *Brosimum utile* KUNTH; 2015.
39. Estrella E, Cedeño J. Medidas de control de bajo impacto ambiental para mitigar la moniliasis (*Moniliophthoraroreri* Cif y Par. Evans et al.)En cacao híbrido nacional x trinitario en Santo Domingo de los Tsáchilas.; 2012.
40. Schnell RJ, Olano CT, Brown JS, Meerow AW. Retrospective determination of the parental population of superior cacao (*Theobroma cacao* L.). *Seedlings and Association of microsatellite alleles with productivity*; 2005.

41. Barros O. Investigaciones sobre el hongo *Monilia roleri* Cif. and Par., causante de la pudrición acuosa de la mazorca del cacao; sus daños y su control. El Cacaotero Colombiano. ; 1977.
42. Cubillos G, Aranzazu F. Comparación de tres frecuencias de remoción de frutos enfermos en el control de *Monilia roleri* Cif & Par. El cacaotero colombiano. 1979; 8(27-34).
43. Aranzazu F. Rehabilitación y renovación de Cacao. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Curso Nacional de Cacao; 1990.
44. Rodríguez E. Técnica de reducción de inóculo para controlar la Moniliasis del cacao en Santander. Rev. Corpoica. 2006; 4(68 - 78).
45. Aranzazu F, Jaimes Y. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en *Monilia* (*Moniliophthora roleri*). In: Hoyos L.M. (ed.). Colombia: Corpoica, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria; 2010.
46. Crespo del Campo E, Crespo F. Cultivo y beneficio del cacao CCN-51 Conejo E, editor.; 1997.
47. Flood J, Murphy R. Cocoa futures: A source book of some important issues facing the cocoa industry. The Commod. 2004;(163 p).
48. Parra D, Sánchez L. El control de la moniliasis en el cacao. Asp. Fitosanit. 2005; 6(23 - 26).
49. Torres de la Cruz M, García Ortiz C, Téliz Ortiz D, Aguilera A, Diaz C.. Temporal progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora roleri*) of cocoa in Tabasco. Plant Pathol. 2011; 93(31 - 36).
50. Jaimes Y, Aranzazu F. manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* l) en colombia, con énfasis en monila (*Moniliophthora roleri*); 2010.
51. Sánchez F, Garcés F.. *Moniliophthora roleri* (Cif y Par). En: Evans et al. El cultivo de cacao. Sci. Agropecuaria. 2012; 3(249 - 258).

52. Krauss U, Hoopen M, Hidalgo E, Martínez A, Arroyo C, Garcia J, et al. Manejo integrado de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao*) en Talamanca, Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*. 2003; 10(37 - 38).
53. Suárez L. Aislamiento e identificación de *Moniliophthora roreri* causante de la moniliasis en municipios del nororiente colombiano y ensayos preliminares para su control biológico. *Rev. Respuestas*. 2006; 11(3 - 9).
54. Johnson J, Bonilla J, Agüero L. Manual de manejo y producción del cacaotero. Leon, Nicaragua.; 2008.
55. Solís J, Ruíz P, Zamarripa A. Mejoramiento genético para resistencia, rendimiento y calidad agroindustrial del cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. *Memorias. IV Reunion Nacional Innovación Agrícola*. Saltillo, Mexico.; 2009.
56. Rodriguez L, Mujica J, Cubillos G. Manejo integrado de la moniliasis del cacao. Corpoica, Litografía La Bastilla Ltda; 2005.
57. Lopes M, Martins E. Principais doenças do cacauero no Brasil. CEPLAC; 2005.
58. Hernández Lauzardo AN, Bautista Baños S, Velasquez del Valle MG. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Rev. Fitotec. Mexico*. 2007 Feb; 30(119 – 123).
59. Barrera L, Bautista S. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*.. 2008 Jan; 26(27-31).
60. Vergara R. De la agricultura tradicional a la agricultura biológica. *Memorias Seminario Regional*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia; 1997.
61. Roteau R, Kutchan M, Lewis G. Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L.. Rockville, US.: American Society of Plant Physiologists; 2000.
62. Ramirez S. Efectividad de extractos vegetales en el manejo de la moniliasis

- (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en MÉXICO. In.; 2013.
63. Chiriboga Chuchuca C, Sánchez Quinche ÁR, Vargas Gonzalez ON, Hurtado Flores LS, Quevedo Guerrero JN. Uso de Infusión de oreganón *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y del vinagre en la crianza de pollos “Acriollados” (*Gallus gallus domesticus*) mejorados. *Acta Agronomica*. 2016 Mar; 65 ( p 298-303 ).
  64. Avila J, Jiménez G, Gonzalez B, Morón F. Reacciones adversas a medicamentos herbarios y otras formas de medicina natural y tradicional en Cuba durante 2001-2004. *Rev Cubana Plant Medicinal*. 2008 Jan; 13.
  65. Avila Rivas S. Tesis de Pregrado. Universidad de Machala; 2015.
  66. Menéndez Castillo R, Pavón Gonzáles V. *Plecthranthus amboinicus* (Lour) Sprng. *Rev Cubana Plant Med*. 1999 Mar; 4.
  67. Annadurai S, Venkatesalu. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. *Parasitology Research*. October 2010 May; 107(pp 1275–1278).
  68. Arcila C, Loarca G, Gonzales E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN*. 2004; 54(1).
  69. García G, Palou G. Mecanismo de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 2008; 2(41-51).
  70. Tanackov K. Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. *FORMATEX*. 2013; 2(839- 843).
  71. Salgado F. El jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista internacional de acupuntura*. 2011 octubre; V.
  72. Carmen B, Chimbo J. Adaptación y caracterización morfológica de plantas

- medicinales subtropicales del cantón echeandía provincia de bolivar Guaranda; 2013.
73. Renobales , Sallés. Plantas de interés farmacéutico. 2001.
  74. Huerta C. Ortiga mayor *URTICA DIOICA* L. medicina naturista. 2007; 1(2).
  75. Joya-Dávila JG, Ramírez-González SI, López-Báez O, Alvarado-Gaona ÁE. Efecto antifúngico de hidrodestilados de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri*. Ciencia y Agricultura (Rev Cien Agri). 2015; 12(2).
  76. Garcia C, Mier G, Alzate D, Mora A, Afanad K. Evaluación de la actividad biológica de aceites esenciales contra *Collectotrichum acutatum* y su acción fitotóxica sobre *Solanum betacea* (Cav) Sendt. Memorias XXVI Congreso Ascolfi. 2006;(8-31).
  77. Pereira G, Campos JL, Chávez D, Anabalón L, Arriagada C. Caracterización del crecimiento micelial del hongo ectomicorrícico *Lactarius* aff. *deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. Quebracho. 2014 Jan; 22(30-39).
  78. Puente M, Campos A, León. Efecto fungicida o fungistático de un extracto vegetal sobre plantas susceptibles al hongo fitopatógeno del suelo *Sclerotium rolfsii* Sacc. en condiciones de cultivo protegido. Memorias XVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas ALAM. 2005;(637-643 pp).
  79. Sanchez M. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre *Moniliophthora roreri* Cif & Par en cacao. Trabajo de grado. Peru: Universidad Nacional de Ucayali, Ciencias Agropecuarias; 2005.
  80. Villamil C, Enrique J, Valbuena J, Orlando V, Rosero S..Evaluacion in vitro de Microorganismos Nativos por su Antagonismo contra *Moniliphthora roreri* Cif & Par en Cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta Agronomica. 2012; 65(6305-6315).
  81. Sangeetha G. La actividad antimicrobiana de las plantas medicinales y la inducción de compuestos relacionados con la defensa en el banano frutos cv. Robusta contra los agentes patógenos de la pudrición de la corona. Revistal Biologica. 2013 Jan; 64(16-25).

82. Silva RV, Navickiene , Kato , Bolzani VS, Méda MCM, Furlan M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochem.* 2002; 59( 521-527).
83. Scalvenzi L, Yaguache-Camacho B, Cabrera , Guerrini A. Actividad antifúngica in vitro de aceites esenciales de *Ocotea quixos* y *Piper aduncum*. *BioAgro.* 2016 Jan; 28(39-46).
84. Gamboa R, Hernández F, Guerrero E, Sanchez A, Lira R. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con Extractos Vegetales Metanólicos de Hojasén (*Flourensia cernua* D.C.), Mejorana (*Origanum majorana* L.) y Trompetilla [*Bouvardia ternifolia* (Ca.)]. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 2003; 21(1).
85. Rodríguez Y, Osorio JA. Evaluación de microorganismos por su potencial antagónico para el control biológico de *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans et al, agente causal de la Monilla del cacao. *Fitopatología Colombiana.* 2005 Jan; 28(14-20).
86. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry.* 2005; 91(621-632).
87. Quisi R. Estudio comparativo de la actividad hipoglucemiante de extracto de ortiga (*Urtica dioica*), extracto berro (*Nasturtium officinale*), y extracto de nogal (*Juglans regia*), EN RATAS (*Rattus norvegicus*), con hiperglucemia inducida. Tesis de grado. Riobamba: ESPOCH; 2012.

## **CAPÍTULO VII**

### **ANEXOS**

## 7.1. Anexos de análisis de varianza.

**Anexo 1.** *Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 48 horas después de la siembra.*

**48 horas**

F.V.	SC	GL	CM	F	F tabla	
					0,05	0,01
<b>Total</b>	150,00	27				
<b>factor a</b>	0,04	1	0,04	0,02	4,32	8,02 <b>NS</b>
<b>factor b</b>	63,00	2	31,5	12,02	3,47	5,78**
<b>factor a*factor b</b>	8,33	2	4,17	7,59	3,47	5,78**
<b>factores vs testigo</b>	23,63	1	23,63	9,02	4,32	8,02**
<b>error</b>	55,00	21	2,62			

**NS**= No significativo; \*= Significativo; \*\*= Altamente significativo.

**Anexo 2.** *Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 72 horas después de la siembra.*

**72 horas**

F.V.	SC	GL	CM	F	F Tabla	
					0,05	0,01
<b>Total</b>	424,96	27				
<b>factor a</b>	8,17	1	8,17	2,78	4,32	8,02 <b>NS</b>
<b>factor b</b>	168,08	2	84,04	28,59	3,47	5,78**
<b>factor a*factor b</b>	56,58	2	28,29	9,62	3,47	5,78**
<b>factores vs testigo</b>	130,38	1	130,38	44,34	4,32	8,02**
<b>error</b>	61,75	21	2,94			

**NS**= No significativo; \*= Significativo; \*\*= Altamente significativo.

**Anexo 3.** *Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 96 horas después de la siembra.*

**96 horas**

F.V.	SC	GL	CM	F	F Tabla	
					0,05	0,01
<b>Total</b>	1078,43	27				
<b>factor a</b>	54,00	1	54,00	9,78	4,32	8,02**
<b>factor b</b>	360,58	2	180,29	32,66	3,47	5,78**
<b>factor a*factor b</b>	157,75	2	78,88	14,29	3,47	5,78**
<b>factores vs testigo</b>	390,10	1	390,10	70,62	4,32	8,02**
<b>error</b>	116,00	21	5,52			

**NS**= No significativo; \*= Significativo; \*\*= Altamente significativo.

**Anexo 4.** *Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 120 horas después de la siembra.*

<b>120 horas</b>						
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F Tabla</b>	
					0,05	0,01
<b>Total</b>	1416,96	27				
<b>factor a</b>	88,17	1	88,17	8,62	4,32	8,02**
<b>factor b</b>	575,08	2	287,54	28,11	3,47	5,78**
<b>factor a*factor b</b>	328,58	2	164,29	16,06	3,47	5,78**
<b>factores vs testigo</b>	210,38	1	210,38	20,57	4,32	8,02**
<b>error</b>	214,75	21	10,23			

**NS**= No significativo; \*= Significativo; \*\*= Altamente significativo.

**Anexo 5.** *Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 144 horas después de la siembra.*

<b>144 horas</b>						
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F Tabla</b>	
					0,05	0,01
<b>Total</b>	3958,71	27				
<b>factor a</b>	192,67	1	192,67	10,04	4,32	8,02**
<b>factor b</b>	1066,33	2	533,17	27,78	3,47	5,78**
<b>factor a*factor b</b>	662,33	2	331,17	17,26	3,47	5,78**
<b>factores vs testigo</b>	1634,38	1	1634,38	85,17	4,32	8,02**
<b>error</b>	403,00	21	19,19			

**NS**= No significativo; \*= Significativo; \*\*= Altamente significativo.

**Anexo 6.** *Análisis de varianza aplicada a la variable crecimiento radial del hongo a las 168 horas después de la siembra.*

<b>168 horas</b>						
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>Gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F Tabla</b>	
					0,05	0,01
<b>Total</b>	4290,96	27				
<b>factor a</b>	187,04	1	187,04	8,55	4,32	8,02**
<b>factor b</b>	910,58	2	455,29	20,82	3,47	5,78**
<b>factor a*factor b</b>	584,08	2	292,04	13,35	3,47	5,78**
<b>factores vs testigo</b>	2150,01	1	2150,01	98,31	4,32	8,02**
<b>error</b>	459,25	21	21,87			

**NS**= No significativo; \*= Significativo; \*\*= Altamente significativo.

**Anexo 7.** *Análisis de varianza aplicada a la variable porcentaje de inhibición que fue tomado al séptimo día (168 horas) después del crecimiento.*

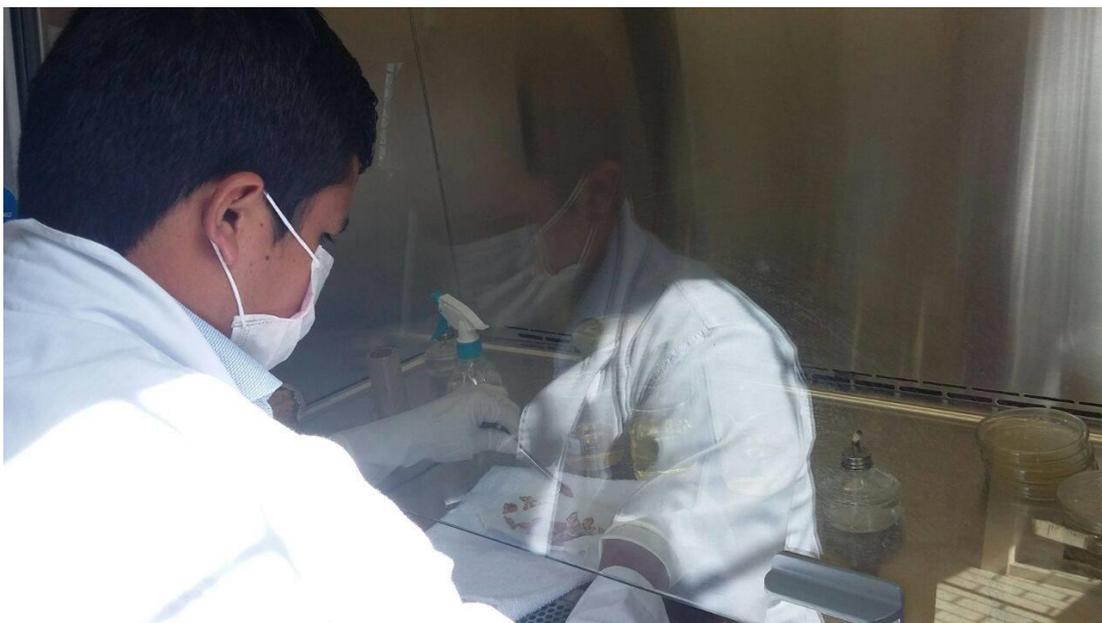
<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>GI</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>F Tabla</b>	
					0,05	0,01
<b>total</b>	6704,95	27				
<b>factor a</b>	293,3	1	293,3	8,58	4,32	8,02**
<b>factor b</b>	1424,44	2	712,22	20,84	3,47	5,78**
<b>factor a*factor b</b>	911,6	2	455,8	13,34	3,47	5,78**
<b>factores vs testigo</b>	3358,04	1	3358,04	98,28	4,32	8,02**
<b>error</b>	717,56	21	34,17			

**NS**= No significativo; \*= Significativo; \*\*= Altamente significativo.

**Anexo 8.** *Cronograma de actividades donde se detallaron las realizadas en la investigación.*

Actividades Meses	Enero				Febrero				Marzo
	1	2	3	4	1	2	3	4	1
Semanas									
Aprobación del anteproyecto		X							
Obtención del micelio del hongo			X	X					
Obtención de los extractos fitoquímicos y preparación de dosis de los fungicidas					X				
Preparación del medio PDA y llenado de cajas						X			
Siembra y medición							X	X	
Tabulación de datos									X

## 7.2. Fotografías de la investigación



**Anexo 9.** *Corte y desinfección del material vegetal que contiene el hongo para la siembra en la caja Petri que contiene el medio PDA.*



**Anexo 10.** *Recolección de las especies vegetales en campo.*



**Anexo 11.** *Lavado de las especies vegetales con agua corriente para luego lavarlas con cloro, alcohol y enjuagado con agua estéril.*



**Anexo 12.** *Control de temperatura del agua utilizando un termómetro para la preparación del extracto mediante el método de infusión.*



**Anexo 13.** *Corte del material vegetal para realizar la maceración.*



**Anexo 14.** *Maceración de las especies vegetales previamente desinfectadas utilizando un mortero.*



**Anexo 15.** *Extractos vegetales preparados por los métodos infusión y maceración contenidos en matraces de 1000 mL.*



**Anexo 16.** *Llenado de las cajas Petri con el medio PDA mas los extractos vegetales y siembra del hongo en el medio.*



**Anexo 17.** *Incubación de las cajas rotuladas con sus debidos tratamientos y repeticiones en una estufa a 30,5 °C.*



**Anexo 18.** *Medición del crecimiento radial del hongo con la utilización de un calibrador cada 24 horas después de la siembra del hongo.*



**Anexo 19.** *Registro de los datos obtenidos en la medición del crecimiento radial del hongo.*