



# UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

## FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

### CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA

Proyecto de investigación previo a  
la obtención del título de Ingeniera  
Agropecuaria

## TITULO.

“Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales de caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidum* L.), sobre el desarrollo del patógeno causante de la monilia (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.)”

### **Autor:**

Lizabeth Jamileth Moncada Sánchez

### **Auspiciante académico:**

M.Sc. Raquel Verónica Guerrero Chuez

**Quevedo – Los Ríos - Ecuador.**

**2017**

## TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO .....	i
INDICE DE TABLAS .....	vi
INDICE DE ANEXOS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
DECLARACIÓN DE AUDITORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....	ix
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	x
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO .....	xi
AGRADECIMIENTO .....	xiii
DEDICATORIA .....	xiv
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT AND KEYWORDS .....	xvi
CÓDIGO DUBLÍN .....	xvii
INTRODUCCIÓN. ....	19
CAPÍTULO I .....	21
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	21
1.1.1. Planteamiento del problema. ....	22
1.2. Problema de la investigación .....	22
Diagnóstico .....	22
Pronóstico .....	22
1.2.1. Formulación del problema .....	23
1.2.2. Sistematización del problema .....	23
En el presente trabajo se plantean las siguientes preguntas: .....	23
1.3. Objetivos .....	23
1.3.1. Objetivo general. ....	23
1.3.2. Objetivos específicos .....	23
1.4. Justificación .....	25
CAPÍTULO II .....	26
FUNDAMENTACIÓN TEORICA DE LA INVESTIGACIÓN .....	26
2.1. Marco conceptual. ....	27
2.1. Marco Referencial. ....	28
2.1.1. Problemas fitosanitarios en el cultivo de Cacao .....	28
2.1.2. Principales enfermedades asociadas al cultivo de cacao .....	28

2.1.3.	Moniliasis.....	28
2.1.3.1.	Importancia económica.....	29
2.1.3.2.	Taxonomía.....	29
2.1.3.3.	Morfología.....	29
2.1.3.4.	Sintomatología y ciclo de vida.....	30
2.1.3.5.	Ciclo de la enfermedad.....	31
2.1.4.	Manejo integrado de las enfermedades en el cultivo de cacao.....	32
2.1.4.1.	Mejoramiento genético.....	32
2.1.4.2.	Control cultural.....	32
2.1.4.3.	Control químico.....	32
2.1.4.4.	Control biológico.....	33
2.1.4.5.	Control Genético.....	33
2.1.5.	Prácticas para manejo de Monilia.....	33
2.1.6.	Uso de extractos vegetales para el control de enfermedades.....	34
2.2.	Caminadora ( <i>Rottboelia exaltata</i> ).....	34
2.2.1.	El ciclo biológico.....	35
2.2.2.	Taxonomía.....	35
2.3.	Coquito ( <i>Cyperus rotundus</i> ).....	35
2.3.1.	Taxonomía.....	36
2.4.	Rosa de muerto ( <i>Calendula officinalis</i> ).....	36
2.4.1.	Descripción botánica.....	36
2.4.2.	Taxonomía.....	37
2.4.3.	Composición química.....	37
2.5.	Culantro ( <i>Eryngium foetidum L.</i> ).....	37
2.5.1.	Descripción.....	37
2.5.2.	Taxonomía.....	38
2.5.3.	Usos.....	38
CAPÍTULO III.....		40
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....		40
3.1.	Localización.....	41
3.2.	Tipo de investigación.....	41
3.3.	Métodos de investigación.....	41
3.3.1.	Manejo del experimento.....	42
3.3.1.2.	Obtención y conservación del patógeno.....	42

3.3.1.3. Aislamiento de <i>M. royeri</i> .....	42
3.3.1.4. Obtención de los extractos vegetales.....	42
3.4. Fuentes de recopilación de información.....	42
3.5. Diseño de la investigación.....	42
3.6. Instrumentos de la investigación. ....	44
3.6.1. Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.....	44
3.6.2. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de los patógenos.....	45
3.6.3. Efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno de <i>M. royeri</i>	45
3.6.4. Variables evaluadas .....	45
3.6.4.1. Porcentaje de germinación.....	45
3.6.4.2. Porcentaje de actividad antifúngica.....	46
3.6.4.3. Estructura del micelio.....	46
3.7. Recursos humanos y materiales.....	46
CAPITULO IV.....	48
RESULTADOS.....	48
4.1. Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.....	49
4.2. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de los patógenos.....	50
4.3. Efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno de <i>M. royeri</i>	51
CAPITULO V.....	53
DISCUSIÓN.....	53
5.1. Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.....	54
5.2. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de los patógenos.....	55
5.3. Efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno de <i>M. royeri</i>	56
CAPITULO VI.....	57
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
6.1. Conclusiones.....	58
6.2. Recomendaciones.....	59
CAPITULO VII.....	60

BIBLIOGRAFÍA.....	60
7.1. Bibliografía.....	61
CAPITULO VIII .....	68
ANEXOS.....	68
8.1. Anexos de análisis de varianza.....	69
8.2. Fotografías de la investigación.....	71

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. <i>Taxonomía de la caminadora</i> .....	35
Tabla 2. <i>Taxonomía del coquito</i> .....	36
Tabla 3. <i>Taxonomía de la rosa de muerto</i> .....	37
Tabla 4. <i>Taxonomía del culantro</i> .....	38
Tabla 5.- <i>Descripción de los tratamientos</i> .....	43
Tabla 6. <i>Esquema de Análisis de Varianza</i> .....	44
Tabla 7. <i>Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas</i> .....	49

## INDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
Anexo 1. <i>Análisis de varianza aplicada al variable efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.</i> .....	69
Anexo 2. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de los patógenos.</i> .....	69
Anexo 3. <i>Análisis de varianza aplicada a la variable evaluación del efecto fungicida mediante el método de placa socavada.</i> .....	69
Anexo 4. <i>Cronograma de actividades realizadas durante el periodo de investigación.</i> .....	70
Anexo 5. <i>Recolección del material vegetativo para la preparación de los extractos vegetales.</i> .....	71
Anexo 6. <i>Preparación de los 4 extractos vegetales etanólicos a utilizar para la investigación.</i> .....	71
Anexo 7.- <i>Desinfección del equipo a utilizar para preparar los medios de cultivos.</i> .....	72
Anexo 8. <i>Preparación del medio de cultivo PDA para la realización de los tratamientos.</i> .....	72
Anexo 9. <i>Diseminación de las esporas del hongo Moniliophthora.</i> .....	73
Anexo 10. <i>Colocación de las esporas del hongo Moniliophthora en los medios de cultivos.</i> .....	73
Anexo 11. <i>Cajas Petri en la incubadora con los tratamientos respectivos.</i> .....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
<b>Figura 1.</b> Ciclo de la moniliasis causada por <i>Monilophthora roreri</i> en cacao.....	31
Figura 2. <i>Curva de crecimiento de M. roreri en medios enmendados con extractos vegetales</i> .....	50

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

Yo, Lizbeth Jamileth Moncada Sánchez, 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.

**Lizbeth Jamileth Moncada Sánchez**

**C.I. 1205306648**

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

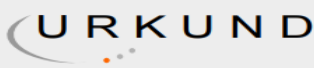
La suscrita, **Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez , M.Sc.** Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la egresada Lizbeth Jamileth Moncada Sánchez, realizó el proyecto de investigación de grado titulado “Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales de caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidun L.*), sobre el desarrollo del patógeno causante de la monilia (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao L.*)”, previo a la obtención del título de Ingeniería Agropecuaria, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

**Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez, M.Sc.**

**DIRECTORA 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, la suscrita Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez M.Sc., en calidad de Directora del Proyecto de Investigación de Grado “Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales de caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidun L.*), sobre el desarrollo del patógeno causante de la monilia (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao L.*)”, De autoría de la estudiante Lizbeth Jamileth Moncada Sánchez, certifica que el porcentaje de similitud reportado por el Sistema URKUND es de 3%, el mismo que es permitido por el mencionado software y los requerimientos académicos establecidos.



---

### Urkund Analysis Result

**Analysed Document:** Tesis Final 1.1.docx (D32804194)  
**Submitted:** 11/23/2017 2:44:00 PM  
**Submitted By:** jnmacias@uteq.edu.ec  
**Significance:** 3 %

Sources included in the report:

TESIS-FINAL.docx (D13143965)  
PY-Wachito-Betty-Kathe-Christ.docx (D30296407)  
Cultivo del Cacao.docx (D11263954)  
<http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=3742>.

Instances where selected sources appear:

12

**Ing. Raquel Verónica Guerrero Chuez, M.Sc.**  
**DIRECTORA DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**



# UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO

## FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS

### CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

#### PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

##### Título:

“Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales de caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidum* L.), sobre el desarrollo del patógeno causante de la (*Moniliophthora roreri*) monilia del cacao (*Theobroma cacao* L.)”.

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

Aprobado por:

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

Dr. Gregorio Vazconez Montufar

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Erick Eguez Enríquez

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

Ing. Orly Cevallos Falquez

Quevedo – Los Ríos – Ecuador

2017

## **AGRADECIMIENTO.**

Primero con mucho amor y gratitud a mi creador, que me dio salud suficiente y oportunidad de vivir esta experiencia como son los estudios superiores, por haber escuchado y contestado a mis oraciones por su guía e iluminación en mi vida por estar ahí siempre, dándome bendiciones y fortaleza más aun cada vez que me desanimaba y mi fe flaqueaba.

A mis adorados padres Gloria y Carlos, a quienes agradeceré infinitamente por ser los co-creadores de esta gran hazaña y financiaron mis estudios universitarios, agradeceré siempre todo lo que han hecho por mí que Dios los bendiga.

A mis queridas amigas Nuria, Susana, Diana y Karen y amigo Danny quienes me apoyaron de manera singular contribuyendo con su cariño, ánimos y consejos.

De igual manera a mi tutora Ing. Raquel Guerrero Chuez por su apoyo incondicional y su paciencia.

A la universidad Técnica Estatal de Quevedo especialmente la Facultad de Ciencias Pecuarias que me abrió las puertas para educarme allí y poder realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones y a cada uno de los docentes que sirvieron en mi tiempo académico del 2011 hasta 2017.

## **DEDICATORIA.**

*El presente trabajo de investigación está dedicado a mis queridos padres Carlos y Gloria quienes me dieron la vida y quienes con sus palabras de amor, cariño y motivación me mantuvieron con el ánimo elevado, por sus sabios consejos en aquellas veces que los desafíos parecían ser mayores que mis fuerzas para continuar y poder culminar este capítulo de mi vida.*

*A mi amado hijo Lian Joanel quien es mi razón de ser, fuerza moral, espiritual e incluso física por el ánimo que me proporciono para que no me rinda y pudiera terminar esta meta. A mis hermanos Jordany, Nelson y Andy por su gran apoyo y de este modo hicieron posible que pueda culminar mis estudios superiores.*

## RESUMEN.

En el presente proyecto de investigación se evaluó el uso de 4 extractos vegetales etanólicos a base de caminadora (*R. exaltata*), coquito (*C. rotundus*), rosa de muerto (*C. officinalis*) y culantro (*E. foetidum* L.), en concentraciones diferentes para el control *in vitro* del patógeno causante de la monilia (*M. roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.)”. La investigación se desarrolló en el laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias UTEQ, bajo un Diseño Completamente al Azar en el que se evaluaron las combinaciones de cuatros extractos vegetales con tres concentraciones cada uno (5, 10 y 15%). En todos los experimentos se compararon los tratamientos con un testigo absoluto (medio de cultivo sin enmendar). Al analizar el uso de 5 extractos vegetales se observa que en los tres tratamientos con extracto de Rosa de muerto (*C. officinalis*) se obtuvo un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *M. roreri*. De las tres concentraciones, la concentración mayor (15%) de extracto de *C. officinalis* fue la más inhibitoria, la germinación de esporas del patógeno en este medio descendió hasta un 77%. En cambio los extractos de caminadora (*R. exaltata*) y coquito (*C. rotundus*) mostraron valores de germinación cercanos al 100% en las tres concentraciones estudiadas, por lo que sus valores no difirieron estadísticamente del testigo (medio de cultivo sin enmendar).

**Palabras claves:** Esporas, Epidemiología, inhibición, cacao, *in vitro*.

## ABSTRACT AND KEYWORDS.

In the present research project evaluated the use of ethanolic extracts 4 based on treadmill (*R. exaltata*), coquito (*C. rotundus*), Rosa (*C. officinalis*) and coriander (*E. foetidun L.*), in different concentrations for the in vitro control of the pathogen *M. roreri* causing the frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao L.*). The research was developed in the laboratory of Food Science of the Faculty of Animal Science UTEQ, under a completely randomized design that evaluated the combinations of four plant extracts with three concentrations each (5, 10 and 15%). In all the experiments compared the treatments with a absolute control (culture medium without amending). To analyze the use of 5 plant extracts in all three treatments with extract of Rosa de muerto (*C. officinalis*) was obtained an inhibitory effect on the germination of the spores of *M. roreri*. Of the three concentrations, the highest concentration (15%) of extract of *C. officinalis* was the most inhibitory, the germination of spores of the pathogen in this medium fell to 77%. On the other hand, the extracts of *R. exaltata* (treadmill) and coquito (*C. rotundus*) showed germination values close to 100% for the three studied concentrations, so that their values did not differ statistically from the witness (culture medium without amending).

**Keywords:** Spores, Moniliophthora roreri, inhibition, cocoa, in vitro.

## CÓDIGO DUBLÍN.

**Título:** “Evaluación in vitro del efecto de extractos vegetales de caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidun* L.), sobre el desarrollo del patógeno causante de la monilia (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.)”.

**Autor:** Lizbeth Jamileth Moncada Sánchez

**Palabras claves:** Esporas Epidemiología cacao antifúngico *In vitro*

**Fecha de publicación:**

**Editorial:** Quevedo: UTEQ, 2017

**Resumen:** En el presente proyecto de investigación se evaluó el uso de 4 extractos vegetales etanólicos a base de caminadora (*Rottboellia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidun* L.), en concentraciones diferentes para el control in vitro del patógeno causante de la monilia (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.)”. La investigación se desarrolló en el laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Pecuarias UTEQ, bajo un Diseño Completamente al Azar en el que se evaluaron las combinaciones de cuatros extractos vegetales con tres concentraciones cada uno (5, 10 y 15%). En todos los experimentos se compararon los tratamientos con un testigo absoluto (medio de cultivo sin enmendar). Al analizar el uso de 5 extractos vegetales se observa que en los tres tratamientos con extracto de Rosa de muerto (*C. officinalis*) se obtuvo un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *M. roreri*. De las tres concentraciones, la concentración mayor (15%) de extracto de *C. officinalis* fue la más inhibitoria, la germinación de esporas del patógeno en este medio descendió hasta un 77%. En cambio los extractos de caminadora (*R. exaltata*) y coquito (*C. rotundus*) mostraron valores de germinación cercanos al 100% en las tres concentraciones estudiadas, por lo que sus valores no difirieron estadísticamente del testigo (medio de cultivo sin enmendar).

**Palabras claves:** Esporas, Epidemiología, inhibición, cacao, in vitro.

In the present research project evaluated the use of ethanolic extracts 4 based on treadmill (*Rottboellia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), Rosa (*Calendula officinalis*) and coriander (*Eryngium foetidun L.*), in different concentrations for the in vitro control of the pathogen (*Moniliophthora roreri*) causing the frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao L.*)". The research was developed in the laboratory of Food Science of the Faculty of Animal Science UTEQ, under a completely randomized design that evaluated the combinations of four plant extracts with three concentrations each (5, 10 and 15%). In all the experiments compared the treatments with a absolute control (culture medium without amending). To analyze the use of 5 plant extracts in all three treatments with extract of Rosa de muerto (*C. officinalis*) was obtained an inhibitory effect on the germination of the spores of *M. roreri*. Of the three concentrations, the highest concentration (15%) of extract of *C. officinalis* was the most inhibitory, the germination of spores of the pathogen in this medium fell to 77%. On the other hand, the extracts of *R. exaltata* (treadmill) and coquito (*C. rotundus*) showed germination values close to 100% for the three studied concentrations, so that their values did not differ statistically from the witness (culture medium without amending).

**Keywords:** Spores , *Moniliophthora roreri*, inhibition, cocoa, in vitro

**Descripción:**

## INTRODUCCIÓN.

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol tropical del cual se obtienen las semillas productoras de chocolate y sus derivados que constituye el tercer producto agrícola más importante en los países tropicales, después del té y el café. La producción mundial anual de cacao es aproximadamente de 3.700.000 de toneladas de las cuales el 68% proviene del continente africano, seguido por Indonesia con un aporte del 12% y de Latinoamérica con 8% y otros países tropicales producen el 10% restante (1).

En el Ecuador, durante más de un siglo, el cacao (*Theobroma cacao* L.) ha sido fuente importante de ingresos para los agricultores y de divisas para el país, llegando a convertirse en uno de los exportadores más grandes a nivel mundial. Posteriormente, el país perdió paulatinamente ese estatus debido al ataque de enfermedades que disminuían drásticamente la producción (2).

La calidad y la producción de cacao se encuentran limitadas principalmente por problemas fitosanitarios, que generan pérdidas de hasta del 100% de las cosechas. Entre las enfermedades más importantes se encuentran las infecciones por hongos fitopatógeno como la Escoba de bruja causada por *Moniliophthora perniciosa*, la Monilia, Moniliasis o pudrición acuosa producida por *Moniliophthora roreri* y la pudrición negra, causada por varias especies de *Phytophthora* spp. (1).

Dado el impacto negativo que tienen estas enfermedades y la poca disponibilidad de herramientas que controlen efectivamente estas enfermedades, es necesario investigar alternativas para el control que sean efectivas, y al mismo tiempo, amigables con el medio ambiente. Una de estas alternativas es el uso de extractos de plantas que han presentado resultados prometedores en varios cultivos de importancia económica. Los extractos vegetales tienen las ventajas de poseer un origen biológico, ser degradables y manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el medio ambiente. A nivel mundial muchos investigadores han demostrado los efectos negativos que tienen los extractos vegetales de ciertas especies sobre el desarrollo de fitopatógenos (3).

Actualmente se han venido realizando evaluaciones de extractos vegetales en el Ecuador, un ejemplo es la investigación realizada por Freire (4), quien realizó el uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganon (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control in vitro de la monilia

(*Moniliophthora roreri* Cif & Par) obteniendo resultados prometedores que podrían ser usados como una alternativa para el control de hongo patógeno como es la monilia (*M. roreri*).

En la presente investigación se presentan los resultados de la evaluación del efecto antifúngico *in vitro* de extractos de plantas sobre aislados del género *M. roreri*, las cuales puedan ser una alternativa de control en cacao. En el reino vegetal algunas especies de malezas y plantas medicinales han sido evaluadas por poseer compuestos antifúngicos y antibióticos, algunas de ellas comunes en nuestro entorno, tales como: la caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro de pozo (*Eryngium foetidum* L.), extractos etanólicos de las mismas que han sido evaluadas a nivel *in vitro* para determinar si causan un efecto.

**CAPÍTULO I.**  
**CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.**

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

El cacao es el cultivo con mayor historia en el país, ya que en sus mejores épocas fue considerado como el mayor exportador del mundo, pero la productividad de este disminuyó considerablemente las plantaciones debido a la presencia de enfermedades tal como la moniliasis.

La moniliasis causada por *Moniliophthora roreri* considerada la principal enfermedad del cultivo en el Ecuador por las pérdidas que ocasiona, su ataque es con frecuencia tan severo que constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de cacao. Esta ocasiona pérdidas que van desde el 16 al 80%, Es un hongo que ataca a las mazorcas causando pudrición de los granos. Las graves pérdidas causadas por este fitopatógeno afectan considerablemente la economía de nuestros agricultores.

## **1.2. Problema de la investigación.**

### **Diagnóstico.**

En Ecuador existen pocos antecedentes de investigaciones a nivel de laboratorio para conocer el efecto antifúngico *in vitro* de estos extractos de plantas sobre estas enfermedades. La mayoría de las investigaciones se han concentrado en evaluar a nivel de laboratorio y de campo el efecto de fungicidas químicos sobre los principales patógenos, por lo que se ve la disponibilidad de alternativas más amigables con el medio ambiente, y a la vez, saludables con los consumidores está limitada.

### **Pronóstico.**

Se realizó el estudio del efecto de extractos vegetales de cuatro especies de plantas de la zona sobre el desarrollo *in vitro* del patógeno causante de la Moniliasis del Cacao, pronosticándose que:

Al menos un extracto vegetal evaluado puede afectar la germinación y desarrollo del patógeno *M. roreri* en una de las concentraciones utilizadas.

### **1.2.1. Formulación del problema.**

Se evaluó *in vitro* el efecto de cuatro extractos vegetales sobre el patógeno *M. roreri*, planteándose la siguiente pregunta:

¿Los extractos vegetales de caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidun L.*) tienen influencia sobre el desarrollo *in vitro* del patógeno causante de moniliasis *M. roreri* del Cacao?

### **1.2.2. Sistematización del problema.**

En el presente trabajo se plantean las siguientes preguntas:

- ¿Cómo actuarán los extractos vegetales de Caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), Rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y Culantro (*Eryngium foetidun L.*) sobre la germinación de esporas del patógeno causante de la Moniliasis?
- ¿Los extractos vegetales evaluados afectan el desarrollo del micelio de los patógenos a nivel *in vitro*?
- ¿Existe alguna variación en la estructura de las hifas de *M. roreri* una vez que son expuestas en los extractos?

## **1.3. Objetivos.**

### **1.3.1. Objetivo general.**

Evaluar el efecto *in vitro* de extractos vegetales de caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidun L.*), sobre el desarrollo del patógeno causante de la Moniliasis *M. roreri* del cacao (*Theobroma cacao L.*).

### **1.3.2. Objetivos específicos.**

- Determinar el efecto de los extractos vegetales de caminadora (*Rottboelia exaltata*), coquito (*Cyperus rotundus*), rosa de muerto (*Calendula officinalis*) y culantro (*Eryngium foetidun L.*), sobre la germinación de esporas de *M. roreri*.

- Evaluar el crecimiento del micelio de *M. roreri* en medios de cultivo enmendados con extractos vegetales.
- Determinar el efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno de *M. roreri*.

#### **1.4. Justificación.**

En el Ecuador, el cacao es uno de los cultivos de importancia y de sustento económico de miles de familias. Al igual que en muchos cultivos, el impacto de las enfermedades produce graves pérdidas que afectan considerablemente el ingreso de quienes hacen de la producción del cacao su fuente de ingreso. Sin embargo, a diferencia de otros cultivos las enfermedades de este cultivo, y en especial la Moniliasis, son complejas de manejar y las herramientas de manejo integrado disponibles son pocas. Encontrar una alternativa de control eficaz y respetuosa con el medio ambiente y con la salud de los consumidores es una necesidad en nuestro medio, por tal motivo, el uso de extractos vegetales se visualiza como opción.

Actualmente, se conoce el efecto positivo que tienen diferentes productos a base de extractos vegetales en el control de numerosos problemas fitosanitarios, señalan algunas ventajas de estos productos como su bajo costo, un buen perfil de seguridad para el hombre y el ambiente.

## **CAPÍTULO II.**

# **FUNDAMENTACIÓN TEORICA DE LA INVESTIGACIÓN.**

## **2.1. Marco conceptual.**

### **Esporas.**

La espora se define como una célula o grupo de células de multiplicación vegetativa o de reproducción, es decir, que sirve para designar a la vez los órganos reproductores tanto asexuados como sexuados. La espora representa una fase del ciclo de vida para muchas bacterias y plantas. Gracias a su extrema resistencia a las condiciones ambientales duras, las esporas intervienen en la supervivencia de una especie. La espora puede dar vida a un nuevo individuo sin fecundación (5).

### **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 (6).

### **Cacao.**

Es un cultivo de la especie *Theobroma cacao*, y que se desarrolla en el trópico húmedo entre las latitudes 15° norte y 15° sur de la línea ecuatorial. De las almendras producidas por esta especie se extraen productos alimenticios, de los cuales el chocolate es el más apetecido por los mercados internacionales (7).

### **Fungicida.**

Se trata de cualquier sustancia capaz de alterar las estructuras de una célula de un hongo logrando inhibir su desarrollo, modificando su viabilidad o supervivencia, ya sea de manera directa o indirecta (8).

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

Se refiere a las técnicas realizadas bajo condiciones estériles y en un ambiente controlado.

## **2.1. Marco Referencial.**

### **2.1.1. Problemas fitosanitarios en el cultivo de Cacao.**

El cultivo de cacao en el Ecuador presenta serios problemas productivos debidos principalmente al ataque de plagas y enfermedades, siendo la más severa la enfermedad conocida como moniliasis (*Moniliophthora roreri*), provocando pérdidas estimadas entre el 50% y el 80% de la producción total anual, dependiendo de las condiciones ambientales, el manejo del cultivo, las medidas de control que se apliquen y las variedades cultivadas (9).

En el Ecuador y especialmente en la región amazónica la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), disminuye la productividad y calidad de las semillas de cacao, afectando negativamente a la economía del agricultor, ya que las condiciones ambientales y el desconocimiento de métodos adecuados de prevención de la enfermedad hacen que el patógeno se prolifere con facilidad (9).

### **2.1.2. Principales enfermedades asociadas al cultivo de cacao.**

El cacao, como cualquier otro organismo viviente, es susceptible a ser atacado por microorganismos patógenos que alteran su desarrollo y causan una o varias enfermedades. Para que se produzca una enfermedad, debe existir un hospedero (la planta) y uno o más patógenos presentes (organismos causales); así como las condiciones ambientales adecuadas para su desarrollo (10).

En el Ecuador, por lo general, las enfermedades del cacao causan más pérdida al agricultor que los insectos. Algunas de las enfermedades pueden destruir todas las mazorcas de la plantación en un momento dado.

Las enfermedades más importantes en el Ecuador son: la escoba de bruja (*M. perniciosa*), la moniliasis (*M. roreri*), el mal de machete (*Ceratocystis fimbriata*) y la mazorca negra (*Phytophthora* spp.) (10).

### **2.1.3. Moniliasis.**

En el año de 1916, el Fitopatólogo James Rorer identificó y describió al hongo causante de la moniliasis, helada o quema del cacao, que hoy en día se conoce como *Moniliophthora roreri* en la zona de Quevedo (Provincia de Los Ríos, Ecuador), por lo que se estableció el área de Quevedo como su centro de origen y distribución. Aparentemente de aquí se disemina hacia el Norte y Sur cubriendo grandes áreas cacaoteras en varios países (11).

Esta enfermedad ataca únicamente a los frutos de cacao y de algunas especies del género *Theobroma* spp. Su ataque con frecuencia constituye un factor limitante en la producción de cacao, las temperaturas altas son más favorables para la diseminación de la misma (11).

#### **2.1.3.1. Importancia económica.**

Se considera que esta enfermedad constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción del cultivo. Puede provocar pérdidas que oscilan entre un 16 y 80% de la producción, llegando en casos graves al 100% de las pérdidas (12).

Usualmente, el ataque de la enfermedad se presenta de manera desbastadora, por lo que es uno de los factores limitantes restrictivos en la producción del cacao. La baja producción en las cosechas va acompañada con la aplicación errónea de las prácticas agrícolas o de la ausencia de eficientes herramientas de manejo integrado, especialmente, la poda fitosanitaria que aplicada adecuadamente puede disminuir este problema hasta en un 30% (12).

#### **2.1.3.2. Taxonomía.**

---

REINO	Fungi
CLASE	Basidiomycetes
SUBCLASE	Agaricomycetidae
ORDEN	Agaricales
FAMILIA	Tricholomataceae
GENERO	<i>Moniliophthora</i>
ESPECIE	<i>roreri</i>

---

FUENTE ALARCON: (13).

#### **2.1.3.3. Morfología.**

*M. roreri* posee micelio septado con doliporos típicos, las esporas provienen de un basidio modificado y se producen en cadenas con maduración basipétala y se desprenden fácilmente del micelio, con un pseudoestroma denso y carnoso sobre el cual el hongo produce los vestigios del píleo. Las esporas son multifuncionales, sirven no sólo para el intercambio genético, sino también para la dispersión, la infección y la supervivencia.

Éstas pueden ser globosas (60%), elípticas (30%) y subglobosas (10%) con un diámetro promedio de  $7\mu\text{m} \times 10.5\mu\text{m}$ ,  $7.5\mu\text{m} \times 11.6\mu\text{m}$  y de  $6.3\mu\text{m} \times 9.3\mu\text{m}$  respectivamente, tienen dos formas de germinación a través del poro germinativo o directamente a través de su pared (14).

Las esporas viejas desarrollan paredes gruesas y se tornan oscuras, las cuales pueden marcar el inicio de la fase de dormancia. El tubo germinativo presenta en el extremo distal una estructura similar a un apresorio y la hifa infectiva. Este es único y en raras ocasiones dobles (14).

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

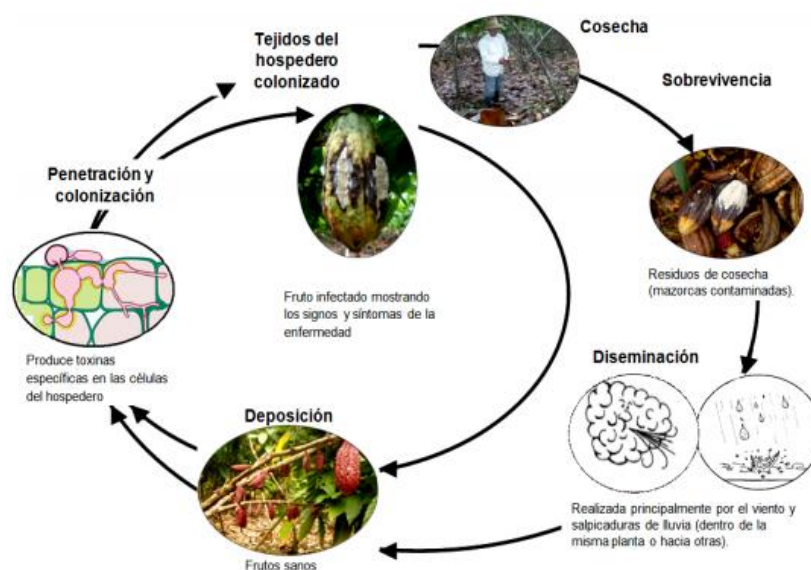
En zonas de cultivo de cacao, la infección se presenta en la superficie de los frutos y en cualquier fase del desarrollo vegetativo, sin embargo la susceptibilidad más alta se observa en los primeros estados de desarrollo del fruto. Una vez que penetra el fruto, el patógeno se desarrolla intracelularmente e invade las células del parénquima cortical. Esta fase es considerada el período más largo de incubación de la enfermedad. 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 anormalidades de formas geométricas y protuberancias o tumores (15).

Las condiciones ambientales juegan papel fundamental en el avance de *M. roreri*. 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 y se deposita en la superficie de las hojas y frutos del hospedero. Los conidios germinan en ambientes húmedos y a temperaturas superiores a  $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en un lapso de 6 a 8 horas, seguido por la penetración en la epidermis con uso de 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 lo cual provoca la muerte del tejido interno y posteriormente del externo. Estas proteínas relacionadas con la patogénesis tienen altas identidades con proteínas halladas en *Moniliophthora perniciosa*, donde se conoce que son secretadas al apoplasto e inducen necrosis en tejidos infectados (15).

### 2.1.3.5. Ciclo de la enfermedad.

La sobrevivencia del patógeno (Figura 1) empieza en los residuos de cosecha (mazorcas contaminadas). Luego, las conidias son diseminadas por el viento y la lluvia, ocurriendo también contaminación de frutos o mazorcas con moniliasis de una plantación a otra. Algo similar mencionan Sánchez y Garcés (16), quienes sostienen que la diseminación de las conidias es realizada por el viento, pudiendo el agua de lluvia tener un papel importante en las infecciones a corta distancia en la copa del cacao. Además, debido al movimiento producido por las labores de cosecha las esporas se movilizan en el aire y bajo condiciones propicias de humedad y temperatura, infectan constantemente los frutos que recién están. La mayor cantidad de esporas de moniliasis se encuentran a un metro de altura en las plantas de cacao. Las conidias se depositan sobre el fruto, germinan si hay agua o mueren por la radiación/desecación; estas al germinar pueden penetrar directamente a la cáscara del fruto. Su penetración ocurre directamente a través de los estomas, creciendo entre las células del córtex, produciendo conidias dentro y en la superficie de los frutos (16).

Una de las características del patógeno es su largo período de incubación antes de aparecer los síntomas. El tiempo de infección puede ser de 3 a 8 semanas, pudiendo variar según la edad del fruto, la severidad del ataque, la susceptibilidad del árbol y las condiciones de clima, principalmente presencia de lluvias, mientras que en frutos tiernos, en días lluviosos y calurosos, el período de incubación se acorta a tres semanas, sin embargo, Cruz (1993) relata que el período de incubación (latente) fluctúa entre 30 y 70 días (16).



**Figura 1.** Ciclo de la moniliasis causada por *Moniliophthora roreri* en cacao.

## **2.1.4. Manejo integrado de las enfermedades en el cultivo de cacao.**

### **2.1.4.1. Mejoramiento genético.**

El control de enfermedades fúngicas en utilización de clones resistentes es, sin duda, la alternativa más atractiva para los agricultores ya que por este método se reducen drásticamente los costos de producción y se favorece el medio ambiente. 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, vulnerables a infecciones por patógenos. Para minimizar este riesgo, dependiendo del sitio de cultivo, es necesario seleccionar clones de cacao adecuados (15).

### **2.1.4.2. Control cultural.**

La práctica de control cultural consistente en la remoción de frutos enfermos, es la más importante para el control de la moniliasis: se trata de cortar las mazorcas con síntomas de la enfermedad, especialmente antes de la etapa de esporulación, con el objeto de impedir que el hongo alcance su etapa reproductiva.

El propósito fundamental de la remoción de mazorcas es disminuir la cantidad de esporas del hongo (inóculo) presente dentro del cultivo, con el fin de evitar la contaminación de las mazorcas que están en formación. La práctica está encaminada fundamentalmente a proteger la cosecha principal del cultivo y, en especial, los pepinos o mazorcas pequeñas, ya que los frutos de menos de dos meses son los más susceptibles al ataque de la enfermedad debido a que el hongo puede penetrar más fácilmente la epidermis de los frutos de esta edad (17).

### **2.1.4.3. Control químico.**

El caso de monilia se recomienda realizar controles preventivos orgánicos ya que un control químico cuando la planta ya está afectada, los resultados son lentos y costosos; sin embargo se puede aplicar caldo bórdeles al 100% cada 21 días, mezcla que es preparada a base de cal agrícola, sulfato de cobre y fijador. Esta actividad debe estar combinada con el control del exceso de sombra y humedad, puesto que esto incide en la proliferación de la enfermedad (18).

#### **2.1.4.4. 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 (19).

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 (19).

#### **2.1.4.5. Control Genético.**

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) (20).

#### **2.1.5. Prácticas para manejo de Monilia.**

Se incluyen a continuación prácticas sobre el manejo que deberían ser tomadas en cuenta en sus cultivos con el fin de reducir la incidencia de la enfermedad (21):

- 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.

#### **2.1.6. Uso de extractos vegetales para el control de enfermedades.**

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades, en el marco de una agricultura sostenible, constituye una alternativa promisorio debido a su elevada efectividad, bajo costo y no tener efectos negativos sobre el medio ambiente (22).

Las plantas producen compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleadas para controlar diferentes enfermedades. La obtención de los extractos vegetales y el estudio de sus compuestos activos propician su empleo contra diferentes fitopatógeno. En condiciones *in vitro*, algunos extractos han mostrado tener capacidad para inhibir el crecimiento del patógeno, así como la esporulación y germinación de esporas, de modo que ayudan a controlar las enfermedades de frutos y hortalizas. 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 (23).

#### **2.2. Caminadora (*Rottboelia exaltata*).**

Esta maleza se considera una de las 20 malezas más agresivas a nivel mundial. En América tropical se ha extendido aceleradamente debido a la gran cantidad de semillas que produce y la rapidez con que se desarrolla (24).

### 2.2.1. El ciclo biológico.

La fase de germinación tiene una duración de 8 a 10 días y un desarrollo vegetativo hasta la floración que puede variar de 45 a 55 días seguidos de la fructificación en un lapso de 10 a 20 días, con un tiempo promedio de 85 días desde la germinación a la fructificación (25). Bajo condiciones favorables germina a los 3 o 4 días luego de sembrada (24).

### 2.2.2. Taxonomía.

**Tabla 1.** *Taxonomía de la caminadora.*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	liliopsida
subclase	commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Genero	<i>Rottboelia</i>
Especie	<i>exaltata</i>

FUENTE: (26).

### 2.3. Coquito (*Cyperus rotundus*).

*Cyperus rotundus* L. resalta por su importancia agrícola, debido a que es conocida como la peor maleza del mundo y se encuentra en más países, regiones y localidades del mundo que ninguna otra maleza (27). *C. rotundus* puede crecer prácticamente en cualquier tipo de suelo y pH, nivel de humedad y contenido de materia orgánica, sin embargo no tolera suelo salino ni sombra; podemos encontrar a esta especie en campos de cultivos de secano (temporal) y de irrigación, en huertas de cítricos, a lo largo de canales de irrigación y zanjales de drenaje, a lo largo de las cercas, en las márgenes de los bosques y en áreas abandonadas (28).

### 2.3.1. Taxonomía.

**Tabla 2.** *Taxonomía del coquito.*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Filo	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Cyperaceae
Genero	<i>Cyperus</i>
Especie	<i>rotundus</i>

FUENTE: (29).

### 2.3.2. Composición química.

La química de la familia Cyperaceae no es bien conocida. Polifenoles, taninos, aceites, etéreos y raramente saponinas de una estructura desconocida han sido reportados. Las ciperonas extraídas de *C. rotundus* se ha dicho que inhiben las síntesis de las prostaglandinas (30).

## 2.4. Rosa de muerto (*Calendula officinalis*).

*C. officinalis* es una planta anual que se cultiva en todo el mundo y sus flores son utilizadas tanto desde el punto de vista ornamental como para la preparación de productos terminados en las industrias farmacéutica y cosmética. En nuestro país, *C. officinalis* crece adecuadamente en condiciones de cultivo y sus flores cumplen con los requisitos establecidos por las farmacopeas internacionales para su uso como planta medicinal (31).

### 2.4.1. Descripción botánica.

*C. officinalis* pertenece a la familia de las compuestas, es una hierba anual, de 30 a 60 cm de altura, hojas simples, alternas, algo gruesas, de oblongas a obovado-oblongas, enteras o diminutas y remotamente denticuladas; cabezuelas solitarias en pedúnculos robustos, vistosos de 3,75 a 5 cm de diámetro, los radios planos, extendidos de color amarillo blanquecino hasta anaranjado subido, que se cierran por la noche (31).

### 2.4.2. Taxonomía.

**Tabla 3.** *Taxonomía de la rosa de muerto.*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Tribu	Calenduleae
Género	<i>Calendula</i>
Especie	<i>officinalis</i>

FUENTE: (32)

### 2.4.3. Composición química.

Según estudios químicos, la *Calendula* posee un extenso número de familias químicas, entre las cuales sobresalen los carotenoides, los flavonoides, triterpenos, saponinas, ácidos fenólicos, taninos, coumarinas, polisacáridos, sustancias pectídicas, hemicelulosas, aceite esencial, etc. Todo lo anterior está en concordancia con la variedad de propiedades farmacológicas presentadas por dicha planta. Similarmente a los estudios farmacológicos, los químicos han sido recientes por lo cual se espera aun el aislamiento de otros tipos de estructuras. (33).

### 2.5. Culantro (*Eryngium foetidum* L.).

El Culantro (*E. foetidum* L.) es una hierba que se siembra en huertos y jardines. Es una hierba de fácil reproducción su semilla es de tamaño diminuto y germina en alto porcentaje (34).

#### 2.5.1. Descripción.

El culantro es una planta herbácea perenne. Todas las partes de la planta producen aceites esenciales que le imparten su fuerte aroma. Las raíces son gruesas y se extienden generalmente a menos de un pie (31 cm) de distancia del tallo. El tallo es muy corto

durante la etapa de crecimiento vegetativo de la planta, pero llega a 2 pies (61 cm) de alto en la etapa de producción de flores y semillas. Las hojas aparecen formando una roseta alrededor de la base del tallo, son alargadas, generalmente entre 5 y 12 pulgadas (13 a 31 cm) de largo, y unas 2 pulgadas (5cm) de ancho, con los bordes aserrados. En su etapa adulta la planta tiene de siete a diez hojas (35).

Las plantas comienzan a florecer aproximadamente a los 3 meses después de la siembra. Las flores son pequeñas y blancuzcas, y salen en grupos en las puntas de ramas del tallo, sobre estructuras en forma de cabezuelas o cilindros de hasta media pulgada (1.3 cm) de largo y 1/5 de pulgada (0.5 cm) de diámetro. Las semillas son pequeñísimas y livianas (de aproximadamente 66,000 a 78,500 semillas por onza), de color pardo cuando están maduras (35).

### 2.5.2. Taxonomía.

**Tabla 4.** *Taxonomía del culantro.*

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Apiales
Familia	Apiaceae
Genero	<i>Eryngium</i>
Especie	<i>foetidum</i>

FUENTE: (36).

### 2.5.3. Usos.

El contenido relativamente alto de aceites esenciales o aromáticos en el cultivo está asociado a sus usos como condimento y planta medicinal. Las hojas y tallos se utilizan como condimento y la planta completa para tratamientos medicinales. En el Caribe, Latinoamérica y Asia tropical, se agrega a sofritos, salsas y pastas. Las hojas contienen un

90% de agua, pero tienen alta concentración de betacarotenos, calcio, hierro, vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina C, vitamina A y proteínas (35).

## **CAPÍTULO III.**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.**

### 3.1. Localización.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Bromatología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, ubicado en la Finca experimental “La María” (km 7,5 de la Vía Quevedo–El Empalme), cantón Mocache, provincia de Los Ríos, entre las coordenadas geográficas de 01° 06’ de latitud Sur y 79° 29’ de longitud Oeste, a una altitud de 120 msnm.

#### 3.1.1. Condiciones Meteorológicas.

**Tabla 5.** Condiciones meteorológicas de la Finca Experimental “La María”

Características Climáticas	Promedios
Temperatura (°C)	18 a 24
Precipitaciones (mm/año)	2583
Altitud (msnm)	74
Humedad relativa (%)	74,00
Heliofanía (horas luz/año)	894,0

FUENTE: (37).

ELABORADO POR: Autor

### 3.2. Tipo de investigación.

El presente trabajo de investigación es de tipo exploratorio que contribuye a fortalecer la línea de investigación:

Desarrollo de conocimiento y tecnologías de agricultura alternativa aplicable a las condiciones del trópico húmedo y semihúmedo del Litoral Ecuatoriano.

### 3.3. Métodos de investigación.

Al realizar el conteo de germinación, medir diámetros de colonias se utilizó un método de investigación cuantitativo. Mientras que en la etapa de observación de hifas al microscopio se manejó el método de observación.

### **3.3.1. Manejo del experimento.**

#### **3.3.1.2. Obtención y conservación del patógeno.**

Para el presente estudio se aisló el patógeno *M. royeri* a partir de tejidos infectados de mazorcas de Cacao (*T. cacao*). Las mazorcas infectadas fueron obtenidas de una plantación de cacao tipo nacional ubicada en la Finca Experimental “La María” (UTEQ).

El material colectado fue colocado en bolsas de papel y transportados en una caja térmica hasta el Laboratorio de Bromatología.

#### **3.3.1.3. Aislamiento de *M. royeri*.**

Las mazorcas con síntomas y/o signos característicos de la enfermedad causada por el patógeno *M. royeri* fueron lavadas con agua estéril. Con la ayuda de un bisturí se removió la corteza y se obtuvieron cortes de la zona de transición entre el tejido enfermo y sano, los mismos que fueron colocados directamente en placas de Petri conteniendo medio agar extracto de malta (AEM) enmendado con penicilina y estreptomicina (10 mg/ml). La incubación se realizó en oscuridad a 25°C+2°C durante 21 días.

#### **3.3.1.4. Obtención de los extractos vegetales.**

Se seleccionaron hojas de plantas sanas de las especies: caminadora (*R. exaltata*), coquito (*C. rotundus*), rosa de muerto (*C. officinalis*) y culantro (*E. foetidun* L.), que según los reportes presentan una elevada cantidad de compuestos con acción sobre fitopatógenos y que además son parte de la flora de la región.

Las plantas se secaron por separado en bandejas de aluminio a temperatura ambiente durante ocho días. Luego se trituraron y se colocaron en frascos de vidrio con alcohol potable (70% alcohol – 30% agua destilada estéril) a razón de 25 g por cada 100 mL de alcohol).

### **3.4. Fuentes de recopilación de información.**

Fuentes primarias: publicaciones científicas, libros, revistas indexadas.

Fuentes secundarias: observación.

### **3.5. Diseño de la investigación.**

Los experimentos se desarrollaron bajo un Diseño Completamente al Azar en el que se evaluaron las combinaciones de cuatros extractos vegetales con tres concentraciones cada

uno (5, 10 y 15%). Adicionalmente, antes de la ejecución del primer experimento se evaluó la germinación de las esporas en medio con alcohol en las mismas tres concentraciones para verificar que no influyen en la germinación de las esporas. En todos los experimentos se compararon los tratamientos con un testigo absoluto (medio de cultivo sin enmendar), y se realizaron dos veces.

**Tabla 6.- Descripción de los tratamientos.**

N°	TRATAMIENTOS	Rep.	Total de U.E
1	AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 5%	10	10
2	AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 10%	10	10
3	AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 15%	10	10
4	AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 5%	10	10
5	AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 10%	10	10
6	AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 15%	10	10
7	AEM + Extracto de al <i>E. foetidun L</i> 5%	10	10
8	AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 10%	10	10
9	AEM + Extracto de <i>E. foetidun L</i> al 15%	10	10
10	AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 5%	10	10
11	AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 10%	10	10
12	AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 15%	10	10
13	AEM sin enmendar	10	10
TOTAL			130

\*R = Repetición, \*UE= Unidad Experimental, ELABORADO: Autor.

Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza y una comparación de medias de Tukey al 5% ( $P \leq 0,05$ ) probabilidad.

**Tabla 7.** Esquema de Análisis de Varianza

Fuentes de variación	Grados de libertad	
Tratamientos	$t - 1$	12
Error experimental	$t(r - 1)$	26
total	$(t*r) - 1$	38

ELABORADO POR: Autor

**El modelo matemático:**

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

**Dónde:**

$Y_{ij}$ =Valor de la variable respuesta i efecto de los tratamientos;  $\mu$ =Valor de la media general;  $T_i$ = Efecto de los tratamientos en estudio;  $E_{ij}$ = Error experimental o efecto alea.

### **3.6. Instrumentos de la investigación.**

#### **3.6.1. Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.**

Para evaluar la germinación de esporas de *M. royeri* en los medios enmendados según los tratamientos ya descritos, se procedió de la siguiente manera:

Se preparó medio de cultivo AEM (150 mL por cada tratamiento), se envasó en matraces de vidrio de 250 mL y se esterilizó en autoclave a 15 p.s.i. durante 15 minutos. Siguiendo los tratamientos se adicionaron los extractos vegetales en las concentraciones señaladas (5, 10 y 15%), para el testigo (tratamiento 13) se utilizó medio de cultivo sin enmendar. Por cada tratamiento se envasaron diez cajas de Petri (diez repeticiones) con 15 mL de medio de cultivo.

La suspensión de esporas del patógeno se preparó colocando 10 mL de agua destilada estéril (con Tween 20 al 0,01%) sobre una colonia de 15 días de edad. Con un asa microbiológica estéril se realizó un raspado para remover las esporas de la superficie. La suspensión obtenida fue colocada en un matraz estéril y ajustada a  $1 \times 10^6$  esporas por mililitro luego de conteo de esporas en una placa de Neubauer.

Por cada tratamiento, se colocaron 0,5 mL de la suspensión de esporas que se distribuyeron sobre la superficie de los medios de cultivo con un asa de Drigalski estéril.

### **3.6.2. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de los patógenos.**

Para evaluar el efecto de los extractos sobre el crecimiento de micelio de *M. roreri* en medios de cultivo, se prepararon los medios de cultivo siguiendo la metodología descrita en el punto 3.6.1.

Por cada tratamiento se prepararon diez cajas de Petri que fueron inoculadas con discos de micelio del patógeno de 5 mm de diámetro obtenidos de la periferia de una colonia de *M. roreri* en AEM de quince días de edad. Por cada repetición (caja de Petri) se colocó un disco de micelio en la parte central y sobre el medio de cultivo.

La incubación se la realizó en una incubadora a 27 °C durante quince días.

### **3.6.3. Efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno de *M. roreri***

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno, se preparó caldo papa dextrosa (200 g de papa y 20 g de dextrosa por litro de medio) y se envasó en matraces de 250 ml previo a su esterilización en autoclave durante 20 minutos a 15 p.s.i y 121 °C. Por cada tratamiento se adicionaron los extractos de acuerdo a las concentraciones detalladas anteriormente.

Una vez enmendados los medios de cultivo se inocularon junto al testigo mediante la adición de tres discos de micelio de *M. roreri* de 5 mm de diámetro (obtenidos de una colonia de quince días de edad) por cada matraz. La incubación se realizó durante 36 horas a 27 °C en oscuridad.

### **3.6.4. Variables evaluadas**

#### **3.6.4.1. Porcentaje de germinación.**

Para verificar la germinación de esporas del patógeno, se realizaron monitoreos a las 4, 6, 8 y 10 horas después de la inoculación. Un conteo final se realizó a las diez horas, tiempo en el que el testigo alcanzó el 100% de germinación.

Con el microscopio óptico (aumento 400 x) se realizó el conteo de esporas en seis campos visuales registrándose el número de esporas germinadas y no germinadas, considerándose como esporas germinadas aquellas con un tubo germinativo con una longitud que aproximadamente duplique el diámetro de la espora.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición de la germinación usando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \frac{\text{Número de esporas no germinadas}}{\text{Número total de esporas}} \times 100$$

#### **3.6.4.2. Porcentaje de actividad antifúngica.**

Con un vernier se midió el diámetro de las colonias (mm) a los 6, 8, 10, 12 y 15 días después de la inoculación. Al final de la evaluación, utilizando los diámetros de las colonias en los tratamientos con extractos y los diámetros de las colonias en las cajas de Petri de los testigos se calculó el porcentaje de inhibición, que fue considerado como indicativo de la actividad antifúngica. Con estos datos se calculará el porcentaje actividad antifúngica usando la fórmula de Ezziyanni (38):

$$\text{Porcentaje de actividad antifúngica} = \frac{\text{Diámetro del testigo} - \text{Diámetro del tratamiento}}{\text{Diámetro del testigo}} \times 100$$

El análisis de datos se realizó con los porcentajes obtenidos en el último día de evaluación (día quince después de la inoculación).

#### **3.6.4.3. Estructura del micelio.**

Luego de la incubación del patógeno en medio líquido, se retiraron los discos de micelio de *M. roreri* y fueron observados en un microscopio óptico (400X y 1000X) para el análisis de las alteraciones celulares de las hifas. La evaluación consistió en constatar si existía desorganización de los contenidos celulares, alteración de la pared celular y fragmentación de las hifas en los discos inoculados en los medios enmendados.

### **3.7. Recursos humanos y materiales.**

#### **Recursos humanos.**

Ing. Raquel Guerrero (Docente Director de tesis)

Srta. Lizbeth Moncada (Autor)

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

- Bisturí
- Mazorcas de cacao

- Bolsas de papel
- Caja Petri
- Mascarilla
- Matraz
- Vernier
- Medio AEM deshidratado
- Mandil
- Guantes
- Balanza
- Estufa
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora

#### **Equipos de oficina.**

- Cámara
- Computadora
- Impresora
- Lápiz
- Hojas
- Pendrive

#### **Reactivos.**

- Agua
- Alcohol potable
- Tween 20
- Agua destilada
- Extracto de caminadora
- Extracto de coquito
- Extracto de rosa de muerto
- Extracto de culantro

**CAPITULO IV.**

**RESULTADOS.**

#### 4.1. Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.

Los resultados del test de Tukey de los datos de germinación de esporas muestran que existe diferencia estadística entre los tratamientos. En la Tabla 8, se observa que en los tres tratamientos con extracto de Rosa de muerto (*C. officinalis*) se obtuvo un efecto inhibitorio sobre la germinación de las esporas de *M. royeri*. De las tres concentraciones, la concentración mayor (15%) de extracto de *C. officinalis* fue la más inhibitoria, el porcentaje de inhibición de la germinación de esporas del patógeno en este medio fue de 23%. Las otras dos concentraciones del extracto de *C. officinalis* (5 y 10%), provocaron una inhibición de la germinación en un 9,4 y 13,6%, respectivamente.

Estos valores fueron seguidos por los presentados por los tratamientos con extracto de Culantro (*E. foetidun*) al 10 y 15%, en los cuales la germinación descendió en un 7,2 y 12,8%, respectivamente. El extracto de esta especie usado en una concentración de 5% no mostró efecto inhibitorio.

Los extractos de caminadora y coquito mostraron valores de germinación cercanos al 100% en las tres concentraciones estudiadas por lo que el porcentaje de inhibición es cero, valores que no difirieron estadísticamente del testigo (medio de cultivo sin enmendar).

**Tabla 8.** Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.

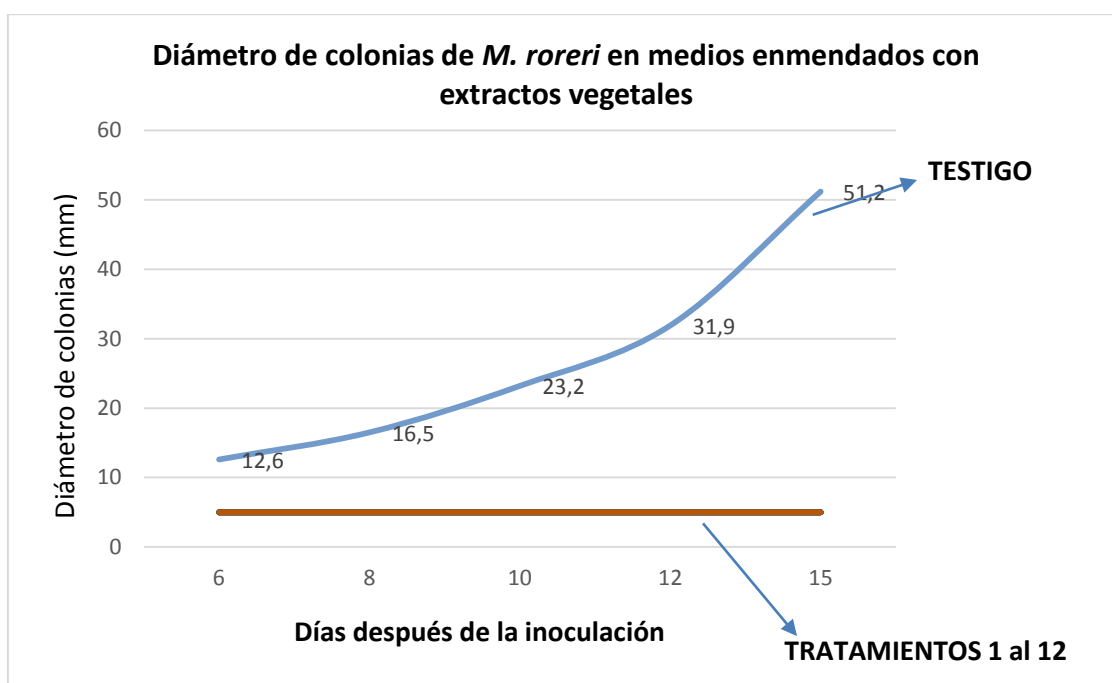
Tratamientos	Porcentaje de inhibición (%)
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 5%	0,0 a
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 5%	0,2 b
AEM sin enmendar	0,2 b
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 5%	0,4 c
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 10%	0,6 c
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 10%	1,6 d
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 15%	1,0 d
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 15%	1,2 d
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 10%	7,2 d
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 5%	9,4 d
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 15%	12,8 d
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 10%	13,6 d
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 15%	23,0 d

ELABORADO POR: Autor

#### 4.2. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de los patógenos.

En la Figura 2, se puede observar la curva de crecimiento del patógeno *M. roreri* en los medios enmendados con los extractos vegetales en tres concentraciones y el de testigo (crecimiento en medio AEM sin enmendar). En la gráfica se aprecia que el patógeno creció de manera continua en el testigo, mientras que en los tratamientos con medios de cultivo enmendados con extractos vegetales no se observó crecimiento, manteniéndose el diámetro de las colonias en 5 mm a lo largo de los quince días de evaluación.

**Figura 2.** Curva de crecimiento de *M. roreri* en medios enmendados con extractos vegetales.



Con los valores obtenidos al día quince (último día de evaluación) se calculó el Porcentaje de actividad antifúngica (Tabla 9). Dado que no se registró valores de crecimiento en ninguno de los tratamientos, el porcentaje de actividad antifúngica para todos los tratamientos con extractos en las tres concentraciones evaluadas fue de 100%, lo que mostraría un efecto negativo de los extractos sobre el crecimiento del patógeno. El ANOVA y el resultado de la prueba de Tukey muestran que todos los extractos difirieron del testigo para la variable porcentaje de actividad antifúngica.

**Tabla 9.** Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de los patógenos.

Tratamientos	Porcentaje de actividad antifúngica
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 5%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 10%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 15%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 5%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 10%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 15%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 5%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 10%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 15%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 5%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 10%	100,0 a
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 15%	100,0 a
AEM sin enmendar	0

ELABORADO POR: Autor

#### 4.3. Efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno de *M. roreri*.

En la Tabla 10, observamos el resultado de la observación microscópica de las hifas del patógeno sometidas a los tratamientos en medio líquidos. Con ninguna de las ampliificaciones usadas con el microscopio compuesto (400X y 1000X) se pudo constatar la desorganización de los contenidos celulares en el micelio de *M. roreri*. De igual manera, en ninguno de los casos se observaron alteraciones en la pared celular; mientras que, para en todos los tratamientos se visualizaron fragmentaciones en las hifas del microorganismo, lo que contrasta con lo observado en el testigo en donde se observan las hifas del patógeno sin ninguna fragmentación.

**Tabla 10.** Efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno de *M. roreri*.

Tratamientos	Desorganización de los contenidos celulares	Alteración de la pared celular	Fragmentación de las hifas
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 5%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 10%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>R. exaltata</i> al 15%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 5%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 10%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>C. rotundus</i> al 15%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 5%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 10%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>E. foetidun L.</i> al 15%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 5%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 10%	NO	NO	SI
AEM + Extracto de <i>C. officinalis</i> al 15%	NO	NO	SI
AEM sin enmendar	NO	NO	NO

**CAPITULO V.**  
**DISCUSIÓN.**

### **5.1.Efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.**

Muchas plantas han sido aceptadas por su uso antifúngico porque en su análisis químico y evaluación farmacológica han demostrado que contiene un principio especial, la búsqueda es muy intensa en casi todo el mundo y se basa en explorar el parentesco sistemático con planta curativas ya reconocidas que han servido para hallar otras nuevas; o bien se han descubierto por casualidad o por validación sistémica de la flora de una región. La capacidad antifúngica de *C. officinalis* podría ser atribuida a la presencia de los compuestos químicos, esto explicaría la actividad que mostro contra el desarrollo fúngico. Esta podría ser la razón por la cual este extracto tuvo mayor incidencia en la germinación de esporas.

Los resultados observados muestran diferencias estadísticas entre los tratamientos con extractos vegetales y el testigo (medio de cultivo sin enmendar), lo que mostraría que los procesos de germinación del patógeno pueden verse afectados por sustancias contenidas en los extractos, tal como lo mostró Ramírez (39), quien evaluó la efectividad de extractos vegetales en el manejo de la moniliasis (*M.a roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en México, en donde se mostró que en un tratamiento con extracto de pimienta se logró un 59,84% de germinación de las esporas del patógeno, mientras que el porcentaje de germinación en el tratamiento químico usado fue mayor (96,87%).

El efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas fitopatógenas ha sido ampliamente reportado, tal como es el caso de autores como Moo-Koh *et al*, (40), quienes en su investigación *Actividad in vitro del extracto acuoso del Bonellia flammea contra hongos fitopatógenos*, mostraron que extractos vegetales de la especie *B. flammea* tuvieron efecto antifúngico sobre la germinación de esporas de patógenos de los géneros *Curvularia* spp., *Bipolaris setariae* y *Lasiodiplodia parva*, inhibiendo la germinación de esporas en un 73 a 100 % en la germinación de conidios dependiendo de la especie del hongo.

En los datos obtenidos por Reyes *et al*,. (41), en su evaluación del efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma* spp. se muestra que extractos de esta especie pueden afectar la germinación de *Trichoderma* spp. en niveles superiores al 90%.

Otros autores que han reportado el efecto de extractos vegetales sobre la germinación de esporas de patógenos son Hernández *et al*,. (42), en su investigación *Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas*, quienes

observaron que extractos crudos de *Allium* spp. y *Capsicum* spp. Afectaron totalmente la germinación de esporas del patógeno *Botrytis cinerea*. En la misma investigación se muestra también que los extractos de nogal negro (*Juglans nigra* L.), liquidámbar (*Liquidambar styraciflua* L.), *Matricaria* spp., durazno (*Prunus persica* L.), peral (*Pyrus communis* L.) y tejo inglés (*Taxus canadensis* Marsh.) inhibieron la germinación entre 90 y 99 %.

En los datos expuestos por Lozada *et al.* (43), en su publicación *Análisis del efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de Lippia spp. sobre Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.*, agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.), mostraron que todos los aceites esenciales evaluados mostraron actividad antifúngica e inhibieron totalmente la germinación de las esporas, cuando fueron utilizados en concentraciones altas (600 - 1000 µg/ml). De todos los aceites esenciales, el aceite de *L. origanoides* fueron los más efectivos al inhibir la germinación en más del 90%.

## **5.2.Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de los patógenos.**

Todos los tratamientos con extractos vegetales mostraron tener un efecto sobre el desarrollo micelial del patógeno. En la literatura científica existen una gran cantidad de reportes en donde se evidencia un efecto similar provocado por otras especies sobre un gran número de patógenos. Como por ejemplo el caso de García *et al.*, (44), quienes al realizar la evaluación de la actividad anti fúngica de aceites esenciales obtenidos a partir de plantas aromáticas, determinaron que las especies limonaria (*Cymbopogum citratus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), ejercieron un efecto inhibitorio sobre el desarrollo del patógeno causante de la antracnosis (*Colletotrichum* spp.) al obtener porcentajes de inhibición alrededor del 74,98%.

Los datos obtenidos mediante el análisis de varianza son superiores a los expuestos por Ocaña (45), en su artículo *Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de extractos vegetales contra Fusarium oxysporum* Snyder y Hans, quienes indicaron que el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del patógeno *F. oxysporum* varió desde 0 (testigo) hasta un 81.79% con el extracto de gobernadora (*Larrea tridentata*) al 2%, siendo estadísticamente diferente a la observada en el testigo.

Los porcentajes de inhibición obtenidos se asemejan a los logrados por Scalvenzi *et al.* (46), quienes señalaron que aceites esenciales obtenidos a partir de hojas frescas de canela

(*Cinnamomum verum*) y matico (*Buddleja globosa*), tuvieron un efecto sobre varios patógenos entre ellos *M. roreri*, cuyo crecimiento micelial fue inhibido en el tratamiento con aceite esencial de *O. quixos*, a la concentración de  $500 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  en un 94%. En la misma investigación, se evidenció que los extractos fueron igualmente efectivos contra *A. oryzae*, *F. solani*, *Phytophthora* sp., *R. stolonifer* a los diez días de ser sembrados.

### **5.3. Efecto de los extractos sobre la estructura de las hifas del patógeno de *M. roreri***

En el estudio realizado por Costa *et al.* (47), sobre la acción de *Syzygium aromaticum* L. Merr. y aceite esencial L.M.Perry en las hifas de algunos hongos, nos muestra que la evaluación microscópica de micelios mostró varios cambios morfológicos tales como, la desorganización contenido celular, disminución de la claridad de la pared celular, la intensa fragmentación y menor turgencia de las hifas resultados que se asemejan a los obtenidos en la presente investigación donde para los tratamientos se observaron alteraciones en la pared celular y fragmentaciones en las hifas lo que contrastó con el testigo en donde las hifas se observaron sin ninguna fragmentación.

**CAPITULO VI.**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**

## 6.1. Conclusiones.

Al analizar el uso de cuatro extractos vegetales sobre la germinación de esporas de *M. roreri* se concluye que el extracto a base de Rosa de muerto (*C.officinalis*) presentó mayores porcentajes de inhibición en comparación con los otros extractos estudiados.

Los extractos vegetales de caminadora (*R. exaltata*), coquito (*C. rotundus*), rosa de muerto (*C. officinalis*) y culantro (*E. foetidun L.*), tuvieron efecto sobre el crecimiento *in vitro* de *M. roreri*, inhibiendo totalmente su desarrollo.

Se observó que los extractos estudiados mostraron tener un efecto sobre la estructura de las hifas del patógeno puesto que se presentó fragmentación de hifas de *M. roreri* durante su crecimiento en medio de cultivo enmendado con los extractos.

## 6.2. Recomendaciones.

Los resultados obtenidos nos muestran que en las plantas de la localidad probablemente exista una alternativa de control de *M. roreri* más acorde con las exigencias de la agricultura actual, por lo que se recomienda:

- Evaluar el efecto de varias dosis de *C. officinalis* con la finalidad de obtener la dosis mínima inhibitoria.
- Analizar los extractos estudiados con la finalidad de identificar los compuestos que estarían ejerciendo un efecto antifúngico sobre el crecimiento de *M. roreri*.
- Estudiar más especies vegetales de la zona, especialmente aquellas utilizadas en la medicina alternada para el control de enfermedades o infecciones causadas por hongos.

**CAPITULO VII.**

**BIBLIOGRAFÍA.**

## 7.1. Bibliografía

1. Hebbbar P. Cacao Diseases: A Global Perspective from an Industry Point of View. *PHYTOPATHOLOGY*. 2007; 97(12).
2. Sánchez F, Garcés F. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*. 2012 agosto.
3. Balandrín M, Klocke J, Wurtele E, Bollinger H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 1985 Junio; 228( 1154-1160).
4. Freire K. uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officale* L.), Oreganon (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control in vitro de la monilia (*Moniliophthora roreri* Cif & Par). Tesis de grado. Quevedo: Universidad Tecnica Estatal de Quevedo , Ciencias Pecuarias; 2017.
5. Kioskea. [Online].; 2014 [cited 2017 12 12. Available from: <file:///C:/Users/HOGAR/Downloads/espora-definicion-17773-mxjnv9.pdf>.
6. Kranz J. The role and scope oh mathematical analisys and modeling in epidemiology. In Bertschinger L. *Modeling Plant Virus Disease Epidemics: Development and Use of Simulation Models*. Springer, Berlin; 1997. p. 7-54.
7. Rodriguez. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE SEIS DOSIS DE ALGAS MARINAS SOBRE LA GERMINACION Y CARACTERISTICAS FENOTIPICAS EN CACAO (*Theobroma cacao* L.) EN VIVERO. Tesis de grado. Guayaquil - Ecuador: Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias; 2013. Report No.: 2706.
8. Santamaria L, Ureta C. *apsnet*. [Online].; 2004 [cited 2017 10 23. Available from: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/fungicidesSpanish.aspx>.
9. Paredes M. El Manejo Fitosanitario del cultivo de cacao Nacional (*Theobroma cacao* L.) y el rendimiento del mismo, en la asociacion Kallari. Tesis doctoral. Ambato: Universidad Tecnica de Ambato, Direccion de Posgrado; 2016.
10. Osorio R. Estudio del efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Moniliophthora roreri* en plantas de *Theobroma cacao* en la Provincia de Esmeraldas.

- Tesis de grado. Quito: Escuela Politécnica Nacional; 2010.
11. Ponce R. Manejo de enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) considerando parametros epidemiologicos que permitan reducir el uso de fungicidas. Tesis. Quevedo - Ecuador: Universidad Tecnica Estatal de Quevedo; 2015.
  12. Enriquez G. Cacao Organico: Guía para productores ecuatorianos. Quito: Instituto Autonomo de Investigaciones Agropecuarias, INIAP; 2004.
  13. Fundacion para el Desarrollo Socioeconómico y Restauración Ambiental. Biblioteca Agroecología FUNDESYRAM. [Online].; 2017 [cited 2017 11 01. Available from: <http://www.fundesynam.info/biblioteca.php?id=3742>.
  14. Gonzales A, Robles A. Aislamiento y Caracterizacion del hongo *Moniliophthora roreri*(Monilla) en frutos de *Theobroma cacao* L. (Cacao) del cultivar San Jose del Real de la Carrera, Usulután. Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. San Salvador - El Salvador: Universidad de el Salvador, Departamento de Química y Farmacia; 2014.
  15. Correa J, Castro S, Coy J. Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronomica*. 2014 Octubre - Diciembre; 63(4).
  16. Sánchez F, Garcés F. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*. 2012;(3).
  17. Estrella E, Cedeño j. Medida de control de bajo impacto ambiental para mitigar la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par.Evans et al.) en cacao híbrido nacional x trinitario en Santo Domingo de los Tsáchilas. Tesis. Santo Domingo - Ecuador: Escuela Politecnica del Ejercito; 2012.
  18. Morales M, Tanguila F. Investigación participativa para el manejo y control manual de monilla (*Monilia roreri*) y escoba de bruja (*Crinipellis perniciososa*), en cacao fino de aroma (*Theobroma cacao*) en producción en dos comunidades del Cantón Archidona, Provincia del Napo. Tesis de Grado. Latacunga - Ecuador : Universidad Tecnica de Cotopaxi, Recursos Naturales; 2011.

19. Jaimes Y, Aranzazu F. Manejo de las enfermedades del Cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia con énfasis en monilla (*Monilophthra roleri*). Primera ed. Hoyos LMC, editor. Colombia: Corpoica; 2010.
20. Aranzazu F. Rehabilitación y renovación de Cacao. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Curso Nacional de Cacao; 1990.
21. Lopes M, Martins E. Principais doenças do cacauzeiro no Brasil. CEPLAC; 2005.
22. Rodríguez A, Morales D, Ramírez M. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. INCA. 2000 Abril - Junio; 21(2): p. 79 - 82.
23. Hernández A, Bautista S, Velázquez del Valle M. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana. 2007 Abril - Junio; 30(2).
24. Blanco M. Efecto de cuatro herbicidas pre-emergentes sobre el control de *Rottboellia cochinchinensis* a nivel de invernadero en cuatro ordenes de suelos dedicados al cultivo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). en Costa Rica. Grado de licenciatura. Costa Rica: Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía; 2006. Report No.: 2238/5891.
25. Vargas J. Diagnóstico preliminar sobre la distribución de *Rottboellia cochinchinensis* en las plantaciones de Caña de azúcar en Costa Rica. San José: DIECA, Dirección investigación y extensión de la caña de azúcar; 1993.
26. Vibrans H. Malezas de México. [Online].; 2010 [cited 2017 10 23]. Available from: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/poaceae/rottboellia-cochinchinensis/fichas/ficha.htm>.
27. Holm LG, Plucknett DL, Pancho JV, Herberger JP. The world's worst weeds, distribution and biology. Honolulu: University Press of Hawaii, East-West Center; 1977.
28. José A, Garsaball L, Méndez J. Efectos de extractos acuosos de la maleza *Cyperus rotundus* L.(Cyperaceae) sobre la germinación de semillas de plantulas de maíz (*Zea*

- mayz L.) cv. Pioneer 3031. Nota científica. Venezuela: Universidad de Oriente, Núcleo de monagas, Agronomía; 2007. Report No.: 1727-9933.
29. Honduras Silvestre. Honduras Silvestre-Educación Helvética S.A. [Online].; 2012 [cited 2017 10 23. Available from: [http://publish.plantnet-project.org/project/riceweeds\\_es/collection/collection/information/details/CYPRO](http://publish.plantnet-project.org/project/riceweeds_es/collection/collection/information/details/CYPRO).
  30. Vega M. Etnobotanica de la Amazonia Peruana. 1st ed. Abya-yala , editor. Quito-Ecuador: Abya-yala; 2001.
  31. Lastra H, Piquet R. Calendula Officinalis. 1999; III(33).
  32. Botànica Online. Calendula Officinalis. [Online].; 2017 [cited 2017 10 24. Available from: [http://www.botanical-online.com/calendula\\_officinalis.htm](http://www.botanical-online.com/calendula_officinalis.htm).
  33. Lastra H, Piquet R. Calendula officinalis. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. 1999 May; III(33).
  34. Sevilla E. Comportamiento del crecimiento y desarrollo de 10 especies medicinales bajo dos tipos de tratamientos en la comunidad de Pacora, San Fransisco Libre. Trabajo de diploma. Managua - Nicaragua: Universidad Nacional Agraria , Recursos Naturales y del Ambiente ; 2005. Report No.: 1060.
  35. Morales J, Brunner B, Flores L, Martinez S. Culantro Organico. Hoja informativa. Lajas - Puerto Rico : Estacion Experimental Agricola de Lajas, Cultivos y ciencias agroambientales ; 2013.
  36. Albarracín A. Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión teporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación in vitro de cilantro cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. Tesis de grado. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército, Ciencias de la vida, Ingeniería en biotecnología; 2012. Report No.: 526.
  37. Onofre J. Parámetros productivos en pollos criollos alimentados con torta de Maracuyá (*Passiflora edulis*) como sustituto de la alimentación base. Tesis de Grado. Quevedo : Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ciencias Pecuarias ; 2017. Report No.: 43000-2258.

38. Ezziyyari M, Perez C, Sid A, Requena M, Candela M. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*. 2004 Mayo; 26.
39. Ramírez S. Estos datos son superiores a los expuestos por Ramírez Efectividad de extractos vegetales en el manejo de la moniliasis (*moniliophthora roreri*) del cacao (*theobroma cacao* l.) en México. Tesis Doctoral. Heredia - Costa Rica: Universidad Nacional de Costa Rica, Departamento de Ciencias Agrícolas; 2013.
40. Moo.koh F, Alejo J, Ramirez A, Tun-Suaréz J, Sandoval R, Ramirez J. Actividad in vitro del extracto acuoso del *Bonellia flammea* against phytopathogenic fungi. *Agrociencia*. 2014 Nov-Dic; 48(8).
41. Reyes C, Martinez D, Morales P, Sobal M, Escudero A, Avila J. Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2014 Nov - Dic; 5(8).
42. Hernandez A, Bautista S, Velásquez M. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hptofrutícolas. *Fitotec.Mexico*. 2007 Nov; 30(2).
43. Lozada B, Herrera L, Perea J, Stashenko E, Escobar P. Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). *CINTROP*. 2012 Jun;; p. 9.
44. Garcia C, Mier G, Alzate D, Mora A, Afanad K. Evaluacion de la actividad biologica de aceites esenciales contra *Collectotrichum acutatum* y su accion fitotoxica sobre *Solanum betacea*. Sendt. *Memorias XXVI Congreso Ascolfi*. 2006;; p. 8 - 31.
45. Ocaña M. Actividad Antifúngica In Vitro de Extractos Vegetales Contra *Fusarium oxysporum* Snyder. Tesis Grado. Saltillo, Coahuila, México : Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro, Botanica ; 2013.
46. Scalvenzi L, Yaguache B, Cabrera P, Guerrini A. Actividad antifungica in vitro de aceites esenciales de *Ocotea Quixos* (Lam.) Kosterm.y *Piper Aduncum* L. *Bioagro*. 2016; 28(1).

47. Costa R, Amaral Z, Martins M, Paula A, Fiuza S, Tresvenzol M, et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas e alguns fungos fitopatogenicos. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*. 2011; 13(2).
48. Sánchez F, Garcés F. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria*. 2012 Aug; 3(73).
49. Peñaherrera S. Combinacion de agentes biológicos para el control de enfermedades del fruto del cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis. Quevedo - Ecuador: Universidad Tecnica Estatal de Quevedo; 2013.
50. Carrion A, García C. Preparacion de extractos vegetales: Determinacion de eficiencia de metódica. Tesis doctoral. Cuenca: Universidad de Cuenca, Departamento de Ciencias Quimicas; 2010. Report No.: 1005.
51. Cerqueira M, Barcellos H, Bueno P, Aires J, Dummer D. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016 Enero; 6(1).
52. Álarcon E. oro de las América para la Investigación y desarrollo tecnológico (FORAGRO): Un camino hacia su consolidación para la cooperación Mexico: FORAGRO; 2001.
53. Alarcón E. Foro de las América para la Investigación y desarrollo tecnológico (FORAGRO): Un camino hacia su consolidación para la cooperación Mexico: FORAGRO ; 2001.
54. Aldona H. El cacao Bogotá - colombia: Terranova; 1995.
55. INIAP. Manual del cultivo de cacao. Manual No. 25. Segunda, corregida y aumentada ed. EET Pichilingue, Quevedo, Ecuador; 1993.
56. Vera B. Material de siembra y propagacion. In manual del cultivo de cacao. Segunda ed.: Instituto Nacional Autonomo de Investigaciones Agropecuarias; 1993.
57. Evans HC, Holmes KA, Reid AP. Phylogery of the frosty pod rot pathogen of cocoa. *Plant Pathol*. 2003; 52(476 - 485).

58. Johnson J, Bonilla J, Agüero L. Manual de manejo y producción del cacao. Leon, Nicaragua; 2008.
59. Ramirez S, Lopez O, Guzmán T, Munguía S, Espinoza S. Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et ál. Dialnet. 2010 Septiembre; XXIV(2).
60. Ramirez S, López O, Guzmán T, Munguía S, Moreno J. El polisulfuro de calcio en el manejo de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*(Cif & Par). Evans et al. del cacao *Theobroma Cacao* L. Dialnet. 2011 Ictubre - Diciembre ; XXIV(4).
61. Vilchis K. Compatibilidad del hongo y extractos vegetales en el manejo integrado de *Meloidogyne incognita* en Frijol. Grado de Maestría. YAUTEPEC, MORELOS: Instituto Politecnico Nacional, Centro de desarrollo de productos bióticos ; 2011.

**CAPITULO VIII.**

**ANEXOS.**

## 8.1. Anexos de análisis de varianza.

**Anexo 1.** *Análisis de varianza aplicada al variable efecto de los extractos vegetales sobre la germinación de esporas.*

F.V.	SC	GL	CM	F	F Tabla
					0,05
<b>Modelo</b>	3538,91	19	186,26	102,74	<0,0001
<b>Trata</b>	3533,29	15	235,55	129,93	<0,0091
<b>Rep</b>	5,63	4	1,41	0,78	0,5454
<b>Error</b>	108,78	60	1,81		
<b>Total</b>	3647,69	79			

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

**Anexo 2.** *Análisis de varianza aplicada a la variable evaluación del efecto Fungcida.*

F.V.	SC	GL	CM	F	F Tabla
					0,05
<b>Modelo</b>	92397,69	21	4395,60	102,74	<0,0001
<b>Trata</b>	92397,69	12	7692,31	129,93	<0,0091
<b>Rep</b>	3,9	9	1,41	0,78	0,5454
<b>Error</b>	6,0	108	0,00		
<b>Total</b>	92397,69	129			

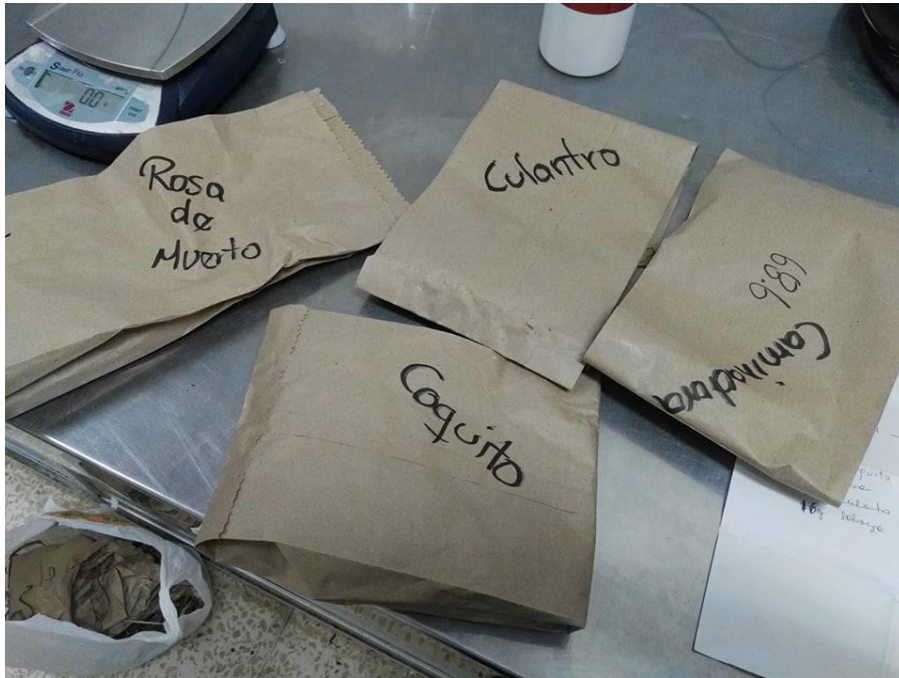
**Anexo 3.** *Análisis de varianza aplicada a la variable evaluación del efecto fungicida mediante el método de placa socavada.*

F.V.	SC	GL	CM	F	F Tabla
					0,05
<b>Modelo</b>			186,26	102,74	<0,0001
<b>Trata</b>	92307	15	235,55	129,93	<0,0091
<b>Rep</b>	5,63	4	1,41	0,78	0,5454
<b>Error</b>	108,78	60	1,81		
<b>Total</b>	3647,69	79			

**Anexo 4.** *Cronograma de actividades realizadas durante el periodo de investigación.*

Actividades Meses	Agosto				Septiembre				Octubre			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
	Semanas											
Aprobación del anteproyecto												
Obtención del cultivo de monilia			X									
Obtención de los extractos etanólicos						X	X					
Preparación del medio PDA y llenado de cajas									X	X	X	
Periodo de incubación											X	
Observación												X
Tabulación de datos												X

## 8.2. Fotografías de la investigación.



**Anexo 5.** *Recolección del material vegetativo para la preparación de los extractos vegetales.*



**Anexo 6.** *Preparación de los 4 extractos vegetales etanólicos a utilizar para la investigación.*



**Anexo 7.-** Desinfección del equipo a utilizar para preparar los medios de cultivos.



**Anexo 8.** Preparación del medio de cultivo PDA para la realización de los tratamientos.



**Anexo 9.** *Diseminación de las esporas del hongo Moniliophthora.*



**Anexo 10.** *Colocación de las esporas del hongo Moniliophthora en los medios de cultivos.*



**Anexo 11.** *Cajas Petri en la incubadora con los tratamientos respectivos.*