



Efecto anti-fúngico de compuestos bioactivos sobre Moniliophthora roreri, agente causal de moniliasis en mazorcas de cacao

Anti-fungal effect of bioactive compounds on Moniliophthora roreri, causal agent of moniliasis in cocoa pods

Efeito antifúngico de compostos bioativos sobre Moniliophthora roreri, agente causal da monilíase em vagens de cacau

Jean Carlos Salinas-Malo ^I

jsalinas7@utmachala.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0007-9303-9869>

Sayda Herrera-Reyes ^{II}

sherrera@utmachala.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-7226-5345>

Ángel Luna-Romero ^{III}

aeluna@utmachala.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-4311-9445>

Edison Jaramillo-Aguilar ^{IV}

ejaramillo@utmachala.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-8241-9598>

Correspondencia: jsalinas7@utmachala.edu.ec

Ciencias Técnicas y Aplicadas

Artículo de Investigación

* **Recibido:** 11 de enero de 2024 * **Aceptado:** 27 de febrero de 2024 * **Publicado:** 17 de marzo de 2024

- I. Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Semillero de Investigación en Fitotecnia, Machala, Ecuador.
- II. Docente en Universidad Técnica de Machala, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Agronomía, Machala, Ecuador.
- III. Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.
- IV. Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

Resumen

El estudio evaluó compuestos bioactivos para controlar la Moniliasis en cultivos de cacao causada por el hongo *Moniliophthora roreri*. Se realizó en el laboratorio de sanidad vegetal de la Universidad Técnica de Machala. EL experimento utilizó un DCA no paramétrico con trece tratamientos replicados cinco veces, totalizando sesenta y cinco unidades experimentales. En la primera fase, se preparó medio de cultivo PDA para la inoculación del hongo. La fase inicial del experimento incluyó la obtención y procesamiento del material vegetal (Ajo, Ají gallinazo, Orégano, Ají rocoto) para elaborar los extractos hidroalcohólicos (EHA). La segunda fase involucró la inoculación e identificación *in vitro* del hongo y la evaluación de su actividad frente a los EHA. La fase final incluyó una prueba de severidad de la enfermedad. Los datos obtenidos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis debido a la nula normalidad y homogeneidad de la varianza en los datos. En la primera variable los Tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6) existió un nulo crecimiento micelial, por ende, son los de mejor resultado, para la segunda variable se evaluó el porcentaje de daño externo de la mazorca tomando en cuenta los mejores resultados obtenidos en la primera variable, dando resultados satisfactorios en el tratamiento T1. En conclusión, los EHA de ajo y orégano exhibieron resultados nulos en el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno a partir de la mínima concentración, a comparación con otros tratamientos. Estas observaciones indican un prometedor potencial en calidad de agentes antifúngicos naturales

Palabras Clave: *Moniliophthora roreri*; Crecimiento micelial; Compuestos bioactivos.

Abstract

The study evaluated bioactive compounds to control Moniliasis in cocoa crops caused by the fungus *Moniliophthora roreri*. It was carried out in the plant health laboratory of the Technical University of Machala. The experiment used a non-parametric DCA with thirteen treatments replicated five times, totaling sixty-five experimental units. In the first phase, PDA culture medium was prepared for fungal inoculation. The initial phase of the experiment included the obtaining and processing of the plant material (Garlic, Ají gallinazo, Orégano, Ají rocoto) to prepare the hydroalcoholic extracts (EHA). The second phase involved inoculation and *in vitro* identification of the fungus and the evaluation of its activity against EHA. The final phase included a disease severity test. The data obtained were analyzed using the Kruskal-Wallis test due to the null

normality and homogeneity of the variance in the data. In the first variable, the Treatments (T1, T2, T3, T4, T5, T6) there was no mycelial growth, therefore, they are the ones with the best results. For the second variable, the percentage of external damage to the cob was evaluated taking into account It counts the best results obtained in the first variable, giving satisfactory results in treatment T1. In conclusion, the EHA of garlic and oregano exhibited null results in the mycelial growth of the phytopathogenic fungus from the minimum concentration, compared to other treatments. These observations indicate promising potential as natural antifungal agents.

Keywords: Moniliophthora roreri; Mycelial growth; Bioactive compounds.

Resumo

O estudo avaliou compostos bioativos para o controle da Monilíase em lavouras de cacau causada pelo fungo *Moniliophthora roreri*. Foi realizado no laboratório de fitossanidade da Universidade Técnica de Machala. O experimento utilizou um DCA não paramétrico com treze tratamentos replicados cinco vezes, totalizando sessenta e cinco unidades experimentais. Na primeira fase foi preparado meio de cultura BDA para inoculação do fungo. A fase inicial do experimento incluiu a obtenção e beneficiamento do material vegetal (Alho, Ají gallinazo, Orégano, Ají rocoto) para elaboração dos extratos hidroalcoólicos (EHA). A segunda fase envolveu a inoculação e identificação in vitro do fungo e a avaliação de sua atividade contra EHA. A fase final incluiu um teste de gravidade da doença. Os dados obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis devido à normalidade nula e homogeneidade da variância dos dados. Na primeira variável, os Tratamentos (T1, T2, T3, T4, T5, T6) não houve crescimento micelial, portanto, são os que apresentam melhores resultados. Para a segunda variável, o percentual de dano externo à espiga foi avaliado levando em consideração os melhores resultados obtidos na primeira variável, dando resultados satisfatórios no tratamento T1. Conclui-se que o EHA de alho e orégano apresentou resultados nulos no crescimento micelial do fungo fitopatogênico a partir da concentração mínima, comparado aos demais tratamentos. Estas observações indicam um potencial promissor como agentes antifúngicos naturais.

Palavras-chave: *Moniliophthora roreri*; Crescimento micelial; Compostos bioativos.

Introducción

Existen hongos fitopatógenos de alta incidencia negativa en el cultivo de cacao, como por ejemplo *Moniliophthora roreri* y *Phytophthora* sp que afectan considerablemente a la producción, de la misma manera, también existe daño foliar provocado por la *Phoma* sp, *Pestalotia* sp (Dubón et al., 2021; Ali et al., 2017). El Basidiomycete *Moniliophthora roreri* es el agente causal de la enfermedad llamada moniliasis, el cual ocasiona daños significativos en los cultivos de cacao. Este hongo se adapta a diferentes entornos y se encuentra en varios países latinoamericanos (Correa, 2014)

América Latina ha sido identificada como el lugar de origen del cacao, y durante un extenso período, México y Centroamérica han sido reconocidos como áreas donde este producto fue domesticado (Abad et al., 2020). El mejoramiento genético de este cultivo ha permitido adaptarse a diversos ambientes, con el objetivo de distribuir a diversos países, ya sea, para su consumo o como una alternativa de ingresos económicos.

Existen variedades con mayor valor económico, dependiendo de los procesos de mejoramiento genético, conducidos por centros de investigación (Tarqui, 2017). En Ecuador predominan dos tipos de variedades: Tipo Nacional y CCN 51 (Vélez, 2022). Estas variedades han conseguido convertirse en un componente fundamental, que provee de significativos recursos económicos (Salous et al., 2020), sin embargo, las enfermedades fúngicas reducen tanto la calidad, como su precio.

Según Dubón et al. (2021), mencionaron que, identificaron 17 géneros de hongos a partir de 103 muestras de cacao que presentaban signos y/o síntomas de enfermedad en algún órgano de la planta (hojas, tejido leñoso, fruto y/o semillas).

Las mazorcas infectadas presentan protuberancias en los frutos y después de 2 a 3 meses, manchas aceitosas color café oscuro, micelio blanco con esporas infectivas (Álvarez et al., 2014). Este fitopatógeno puede ocasionar grandes pérdidas de hasta el 90% de la producción total. Las condiciones ambientales juegan un 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 (Suarez et al. 2010).

El uso excesivo de químicos puede ocasionar resistencia en algunos individuos de la población fúngica, lo cual logran sobrevivir, multiplicarse y propagarse, a pesar de haber sido expuestos a la aplicación de un fungicida que normalmente controlaba a esa población (Hobbelen, 2014; Pabon, 2023). El control biológico como manejo integrado de plagas (MIP) es una de las técnicas que se

ha venido desarrollando satisfactoriamente (Mejía et al., 2008). La *Trichoderma* sp., ha logrado control varias enfermedades de origen fúngico en el cacao (moniliasis, escoba de bruja) (Tirado-Gallego, 2016). Los sustratos orgánicos han logrado ser alternativa de control, que funcionan como antifúngicos consiguiéndose buenos resultados (Pabón, 2023).

Otra alternativa de control son los extractos vegetales, que presentan un efecto inhibitorio sobre las enfermedades, además, se pueden degradar y manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud animal y medio ambiente (Isman, 2006). Sin embargo, es necesario indagar sobre potencial de estos derivados en aspectos moleculares, bioquímicos y morfológicos, tanto del hospedero como del patógeno, con el fin de conocer el modo y mecanismo de acción toxicológico y así determinar cuáles son los compuestos responsables de la actividad antifúngica (Mesa, 2019).

Los extractos de origen vegetal contienen ingredientes activos, por ejemplo, el ajo (*Allium sativum*) se puede atribuir el efecto antifúngico a la presencia de alicina; mientras que en el orégano (*Origanum vulgare* L.) se le atribuye a la presencia de timol y carvacrol (Juárez-Segovia, 2019).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antifúngico de compuestos bioactivos en el comportamiento de *Moniliophthora roreri*, agente causal de la moniliasis de cacao (*Theobroma cacao* L.) a nivel in vitro – in situ, en busca de una alternativa para el control.

Materiales y métodos

Ubicación del área experimental

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad Vegetal, ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad Técnica de Machala, en la provincia de El Oro, Ecuador. Durante la ejecución del experimento, se tomaron nota de los promedios temperatura y humedad relativa, que fueron de aproximadamente 25 °C y un 68% de humedad relativa, respectivamente.

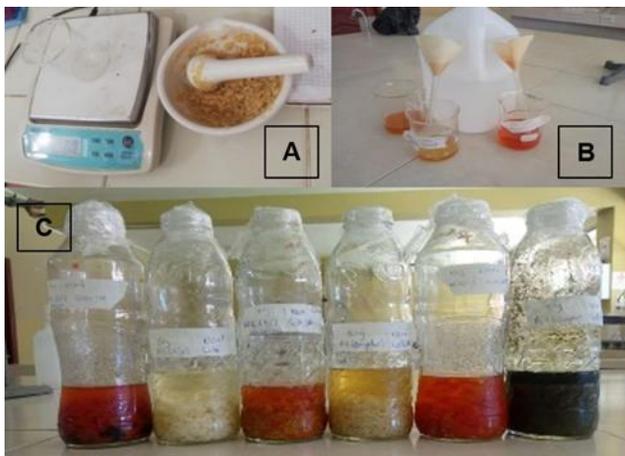
Material Biológico

El hongo *Moniliophthora roreri* usado en la investigación fue adquirido en el campo de la finca ubicada en el sitio Muyuyacu, parroquia El Progreso, cantón Pasaje, provincia El Oro.

Elaboración de Extractos

Para ello se obtiene el material vegetal sano, que no contenga algún tipo de hongo o patógeno que pueda contaminar el extracto. En este caso se preparó extractos hidroalcohólico (EHA), en relación 2:1.1. Se pesa 100g del material vegetal en 50 ml de etanol y 50 de agua destilada esterilizada, se lo deja macerar durante 7 días, filtrando al finalizar este periodo (Báez, 2021).

Figura 1: Selección de mazorca infectadas.



Al seleccionar los frutos, se consideraron síntomas de la enfermedad. Estos indicios fueron: maduración prematura, marchitez, secamiento, abultamientos, mancha café y felpa blanca (Álvarez et al., 2014). Las mazorcas infectadas son almacenadas en bolsas plásticas y se elimina la mayor cantidad de aire, luego se cierran y son transportas a laboratorio para el siguiente proceso.

*Figura 2: Mazorca con síntomas visibles de moniliasis (*Moniliophthora roreri*).*



Preparación de medio de cultivo

Se prepara el medio de cultivo para el desarrollo del hongo a nivel in-vitro. En este caso, para la preparación se usa PDA (Papa dextrosa agar) en cantidades ya establecidas por el fabricante.

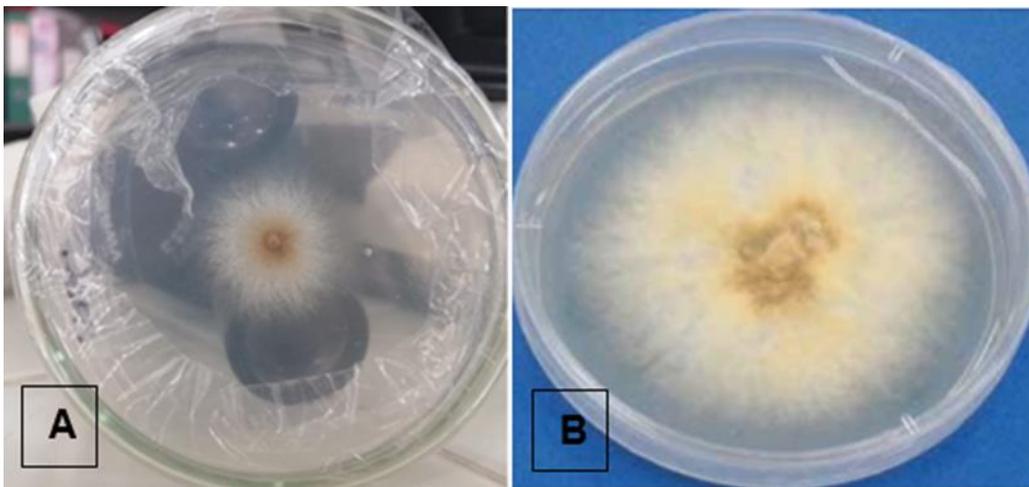
Figura 3: Medio de cultivo líquido PDA (Papa dextrosa agar).



Inoculación in-vitro del hongo fitopatógeno

Consistió en tomar el hongo adherido a la mazorca y ubicarlos en el medio de cultivo solidificado. La inoculación del hongo en las placas Petri con el medio de cultivo se lo realizó en una cámara de flujo laminar, con el objetivo de garantizar un ambiente estéril y libre de contaminantes.

Figura 4: Moniliophthora roreri, obtenida de mazorcas de la Finca (A). Según Lozada et al., (2012), el aspecto macroscópico de las colonias (B).



Diseño Experimental:

El experimento tuvo un Diseño de Completamente al Azar (DCA), que incluyó trece tratamientos, detallados en la Tabla 1, con el fin de asegurar la confiabilidad en los resultados y reducir los errores experimentales. Para cada tratamiento, se realizó cinco repeticiones, sumando un total de sesenta y cinco unidades experimentales (UE). Se estableció que la UE es representada por cada placa Petri inoculada en el medio de cultivo Papa Dextrosa - Agar (PDA).

Tabla 1: Tratamientos asignados

Extracto	Dosis (ppm)	Tratamientos
Orégano	1.000	T1
	3.000	T2
	6.000	T3
Ajo	1.000	T4
	3.000	T5
	6.000	T6
Ají Peruano	1.000	T7
	3.000	T8
	6.000	T9
Ají Gallinazo	1.000	T10
	3.000	T11
	6.000	T12
Testigo	0	T13

Desarrollo del Ensayo

El ensayo se realizó en tres fases secuenciales, en cuanto a la primera fase, para inocular el hongo se preparó medio de cultivo PDA, en esta fase también incluye la recolección y procesamiento del material vegetal (Ajo, Ají gallinazo, Orégano, Ají peruano), con el fin de elaborar los EHA (Extractos Hidro-alcohólicos) para el posterior uso, conforme los tratamientos ya establecidos.

La segunda fase del ensayo consistió en la inoculación in vitro del hongo capturado in vivo de las mazorcas con síntomas de la enfermedad, después de la inoculación del hongo se procedió a la identificación, tomando en cuenta las características macroscópicas, microscópicas y ADN del hongo. Esta fase también incluye la evaluación de la actividad fúngica del hongo *Moniliophthora*

roreri frente a los EHA. Para evaluar esta actividad se usó la técnica de agar envenenado, esta técnica consiste en al PDA esterilizado durante 20 minutos (15 lb pulg-2), las concentraciones establecidas de acuerdo con el tratamiento. El PDA + EHA se vertió en placas Petri, donde posterior a la solidificación del PDA, se inoculó micelio de aproximadamente 5 mm de diámetro en cada placa Petri.

Para la fase final, se realizó una prueba de severidad de la enfermedad, esta prueba se la realizó en campo, aislando y contaminando con el hongo *Moniliophthora roreri*, después de la contaminación realizada a todas las mazorcas se procedió a la aplicación de los extractos que lograron un mejor resultado en la prueba in vitro (EHA de Ajo, EHA de Orégano). Estas mazorcas se las monitoreo durante 15 días, comenzando desde la aplicación. Una vez cumplido los 15 días, se evaluó el daño externo de las mazorcas.

Variables estudiadas:

a. Crecimiento de micelio.

La recolección de información se desarrolló periódicamente cada dos días, desde el inicio del experimento hasta que el hongo del tratamiento testigo alcanzó su máximo desarrollo. Durante este lapso, se supervisó el crecimiento del micelio en cada placa Petri mediante el uso de una regla calibrada. Las mediciones de la longitud micelial fueron tomadas directamente de las placas Petri, empleando cuatro cuadrantes como puntos de referencia. Las dimensiones del hongo se controlaron de cerca a través de las medidas precisas en las placas de Petri, que proporcionaron un seguimiento meticuloso del progreso de su desarrollo.

b. Porcentaje de Severidad de la Enfermedad.

En la prueba de campo las mazorcas fueron aisladas y contaminadas intencionalmente con el hongo patógeno *Moniliophthora roreri*. Una vez que todas las muestras fueron inoculadas con el hongo, se aplicaron de manera estratégica los extractos obtenidos previamente en estudios in-vitro, donde demostraron ser los más eficientes inhibiendo el desarrollo fúngico, particularmente el EHA de Ajo y el EHA de Orégano. El estado de las mazorcas infectadas se monitoreó durante quince días desde la inoculación de las esporas en los tratamientos. Al cumplirse este periodo, se evaluó el daño externo, según la Tabla 10 establecido por Ayala (2016).

Análisis estadístico

En el análisis estadístico de los datos, se llevó a cabo una evaluación de normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk, junto con un análisis de homogeneidad mediante la prueba de Levene. Estos procedimientos se realizaron con el propósito de determinar si era apropiado utilizar una prueba paramétrica o no paramétrica. La elección recayó en la utilización de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para contrastar las medianas entre los diversos tratamientos. La elección de esta prueba se basó en que los datos no cumplían con los supuestos del análisis de varianza (ANOVA), como la normalidad en la distribución de los datos o la homogeneidad de la varianza.

Resultados y discusión

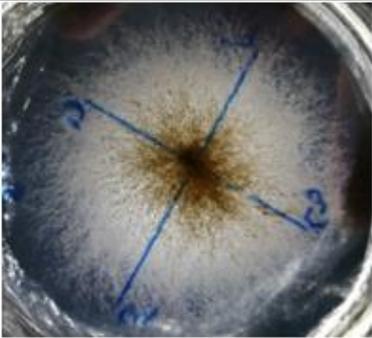
Obtención e identificación morfológica

Para la identificación, se siguió el protocolo propuesto por Murillo (2022), en la que menciona, que pasado los diez días se realiza la caracterización macroscópica y microscópica de los aislamientos.

Características Macroscópicas.

1. Se empleó una regla milimétrica para llevar a cabo la medición del diámetro de las colonias de *Moniliophthora roreri*.
2. Seguidamente se observó: Colores, texturas y bordes que las colonias presentaban.

Tabla 2: Características macroscópicas específicas de *Moniliophthora roreri* (cif) H. C. Evans, Stalpers, Samson & Benny. (1978).

Colonia de <i>Moniliophthora roreri</i>	Características macroscópicas.	
	Centro	Puntiforme
	Formación de anillos	Si
	Coloración	Blanco o Marrón
	Borde	Regular/Irregular
	Textura	Algodonosa

Características microscópicas

1. Estas esporas fueron depositadas en un portaobjetos y posteriormente se tiñeron con azul de metileno para facilitar su observación bajo el microscopio
2. Las esporas fueron caracterizadas en base a su tipo **Tabla 3**.

Tabla 3: subglobosas, globosas y elípticas

Medidas

Subglobosas. 4-5 μm

Globosas. 7-8 μm

Elípticas. 9-11 μm

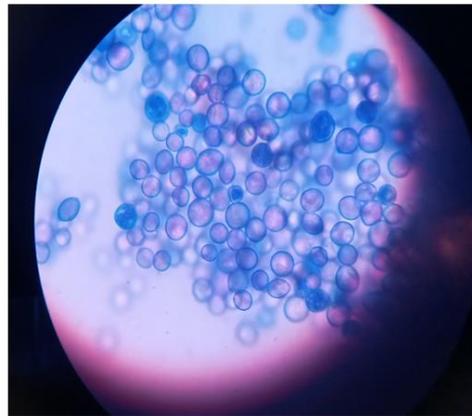
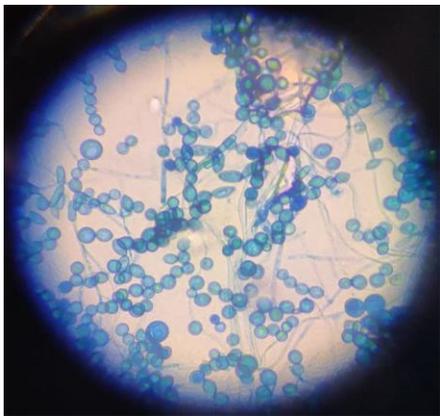
Conforme menciona Murillo (2022), las colonias de *Moniliophthora roreri*., aisladas presentan características macroscópicas y microscópicas uniformes en todas las cepas.

Tabla 4: A. muestra tomada, B. Muestra de Murillo (2022).

Forma de esporas.

Esporas subglobosas, globosas y elípticas de la muestra tomada en campo.

Esporas subglobosas, globosas y elípticas, observadas por Murillo (2022), en el artículo “Aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny. (1978). de frutos de *Theobroma cacao* L”.



A.

B.

Identificación molecular

- Se realizó la extracción de ADN por métodos convencionales, utilizando aproximadamente 100 gr de muestra
- Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de microvolúmenes y visualización en gel de agarosa.
- Se diluyó el ADN hasta una concentración de aproximadamente 20ng/uL para su amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los primers ITS: ITS1/ITS4 [1]
- Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER
- Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas usando programas bioinformáticas.
- Se compararon las secuencias ensambladas de las muestras con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI para su identificación taxonómica.

Tabla 5: Resumen de Resultados "Prueba de ADN"

Código de IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	N° de Accesión
H565	JC	726	99.7	<i>Moniliophthora roreri</i>	ITS	100	OM777758.1

Los resultados de la prueba confirmaron la presencia del hongo *Moniliophthora roreri*, lo cual era previsible tanto a nivel macroscópico como microscópico.

Crecimiento micelial

El análisis exploratorio de datos realizado, fue con el fin Conocer si los datos cumplen con los supuestos de normalidad y homogeneidad. Con el fin de verificar la normalidad de los datos, se llevó a cabo la prueba de Shapiro-Wilk, tomando en cuenta el nivel de significancia establecido p (0.05). Durante el análisis efectuado, el nivel de significancia fue p (< 0.0001), lo que confirma que la distribución de los datos no se ajusta a una curva normal Tabla 6.

Tabla 6: Prueba de normalidad de los datos.

VARIABLE	N	MEDIA	D.E	W*	P(UNILATERAL D)
RDUO PENDIENTES	65	0	0.16	0.8	< 0.0001

Para verificar el supuesto de homocedasticidad de varianzas se realizó la prueba de Levene, para ello, se estableció un nivel de significancia p (0.05). En este análisis realizado, el resultado obtenido fue p (< 0.0001), esta observación ratifica la falta de homogeneidad en los datos.

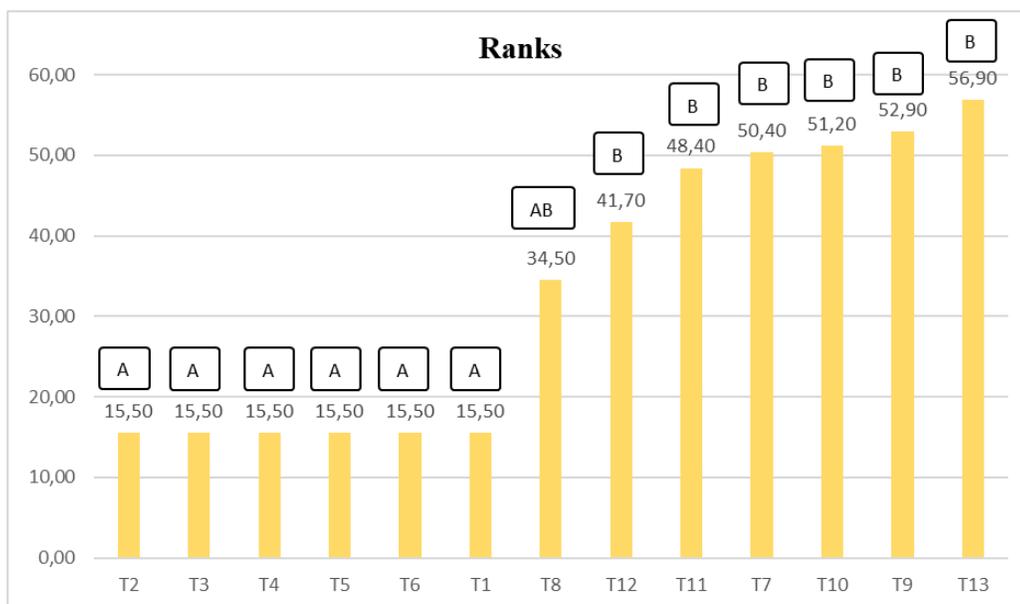
En conclusión, los datos no cumplen con la normalidad ni la homogeneidad entre los tratamientos. En consecuencia, se optó por realizar una prueba no paramétrica, específicamente la prueba de Kruskal-Wallis, en la Tabla 7 se evidencia que existen diferencias significativas en al menos un tratamiento en relación con su impacto antifúngico ($H = 52,50$ p < 0.0001).

Tabla 7: Prueba de Kruskal-Wallis entre los tratamientos establecidos.

Variable	Tratamientos	N	Medias	D.E	Medianas	H	p
PENDIENTES	T1	5	0.00	0.00	0.00	52.50	<0.0001
PENDIENTES	T10	5	5.03	0.17	4.98		
PENDIENTES	T11	5	4.98	0.08	4.98		
PENDIENTES	T12	5	4.83	0.09	4.89		
PENDIENTES	T13	5	5.18	0.04	5.17		
PENDIENTES	T2	5	0.00	0.00	0.00		
PENDIENTES	T3	5	0.00	0.00	0.00		
PENDIENTES	T4	5	0.00	0.00	0.00		
PENDIENTES	T5	5	0.00	0.00	0.00		
PENDIENTES	T6	5	0.00	0.00	0.00		
PENDIENTES	T7	5	5.04	0.32	5.14		
PENDIENTES	T8	5	4.61	0.15	4.65		
PENDIENTES	T9	5	5.23	0.48	5.26		

Los tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6) exhiben rangos muy bajos de crecimiento Figura 5, lo cual sugiere una notable eficacia en términos de actividad antifúngica contra el hongo *Moniliophthora roreri*. En cambio, los tratamientos (T7, T8, T9, T10, T11, T12) muestran rangos considerablemente alejados de cero Figura 5, indicando una menor efectividad en la inhibición micelial del hongo fitopatógeno.

Figura 5: Los tratamientos con los rangos más bajos fueron los de mejor efecto anti-fúngico frente al hongo "*Moniliophthora roreri*".



En los tratamientos (T2, T3, T4, T5, T6, T1) no existe diferencia significativa entre sí, de la misma manera los tratamientos (T12, T11, T7, T10, T9, T1), tampoco existe diferencia significativa entre sí. Mientras que el T8 no establece una diferencia significativa entre los tratamientos (T2, T3, T4, T5, T6, T1) Tabla 8.

Tabla 8: Rangos con una letra en común no son significativamente diferentes de ($p > 0,05$).

Tratamientos	Ranks
T2	15.5 A
T3	15.5 A
T4	15.5 A

T5	15.5	A	
T6	15.5	A	
T1	15.5	A	
T8	34.5	A	B
T12	41.7		B
T11	48.4		B
T7	50.4		B
T10	51.2		B
T9	52.9		B
T13	56.9		B

En la investigación de Ramírez et al, (2011) concluye que, los extractos derivados del Orégano contienen compuestos metabólicos que tienen la capacidad de detener el desarrollo y la producción de esporas del hongo *M. roleri*, respaldando los resultados de inhibición fúngica frente al hongo. Según Ramírez et al, (2011) asegura que, el método de extracción más efectivo resultó ser el hidrolato por destilación, dado que las plantas analizadas exhibieron los efectos de inhibición más significativos., sin embargo, en esta investigación demostró que los EHA son igual de efectivos. En el EHA de Ajo, (Mora, 2021) asegura que, en condiciones controladas de laboratorio, se observaron resultados superiores en la inhibición del crecimiento radial de *M. roleri* con el extracto de Ajo a una concentración de 2.000 ppm.

Los resultados de estas investigaciones corroboran los resultados obtenidos en esta investigación, por lo tanto, estos extractos son efectivos en la inhibición in-vitro del hongo *Moniliophthora roleri*. Sin embargo, esta eficacia puede variar según el material vegetal o las concentraciones.

Porcentaje de severidad de la enfermedad

En la prueba de severidad se eligió los tratamientos con los rangos de crecimiento cercano a cero, lo que indica que son los mejores resultados inhibitorios in-vitro, en este caso fueron los EHA de Ajo en (1.000 pmm) y EHA de orégano (1.000 ppm). Se dividió en tres nuevos tratamientos Tabla 9.

Tabla 9: *Tratamientos asignados.*

TRATAMIENTO	EXTRACTO (M.V)	CONCENTRACIÓN (ppm)
T1	Ajo	1.000
T2	Orégano	1.000
T3	Testigo	-

En la evaluación de la gravedad de la mazorca, se consideró una escala propuesta por (Ayala, 2016), la cual se expresa en porcentaje, como se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10: *Escala de clasificación de síntoma (Ayala, 2016).*

Daño Interno (%)	Sintoma	Daño Interno (%)	Sintoma
0		41 – 60	
1 – 20		61 - 81	
21 - 40		>80	

Dando como resultado que en el T1 (Ajo 1.000 ppm), se observa un rango cercano a cero Tabla 10. A comparación con el T2 (Orégano 1.000 ppm), que contrario al T1, exhibe un rango alejado de cero.

Tabla 11: Comparación de las medias por el método de Kruskal-Wallis.

Variable	Mazorca	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
% Severidad	T1	8	19.38	19.45	8	5.36	< 0.0671
% Severidad	T2	8	41.88	37.68	51		
% Severidad	T3	8	63.25	32.08	71		

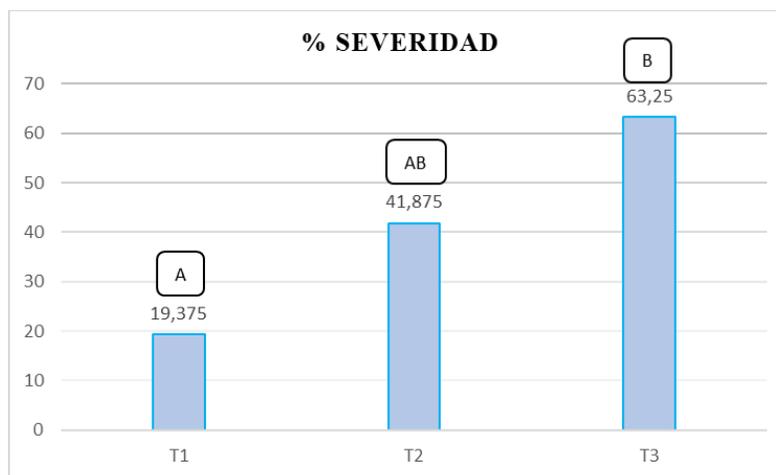
En la comparación de rangos, el T2 tiene una media alejada al cero, pero no establece una diferencia significativa con respecto al T1, mientras que entre los tratamientos T1 y T3 exhiben una diferencia significativa Tabla 12.

Tabla 12: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Mazorca	Medias	N	E.E	
T1	19.38	8	10.85	A
T2	41.88	8	10.85	A B
T3	63.25	8	10.85	B

En la Figura 6, se compara los niveles de daño del hongo sobre la mazorca inmersa con los EHA a diferentes concentraciones ya establecidas. Obteniendo resultados satisfactorios en el T1, ya exhibe un rango cercano a cero.

Figura 6: Comparación de los tratamientos de la variable “nivel de severidad” en la mazorca.



Una combinación de estos dos EHA (Ajo y Orégano) pueden mejorar el proceso inhibitorio frente a *M. roreri*, cada EHA contiene compuestos bioactivos, por ejemplo, (Juárez-Segovia, 2019) asegura que en el ajo se puede atribuir el efecto antifúngico a la presencia de alicina; mientras que en el Orégano se le atribuye a la presencia de timol y carvacrol.

Conclusión

En conclusión, estadísticamente los tratamientos a base de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare* L.), fueron eficaces en inhibir el crecimiento in vitro del hongo fitopatógeno (*Moniliophthora roreri*), a partir de concentraciones bajas (1.000 ppm) en comparación con los demás tratamientos. En la variable “porcentaje de severidad de la enfermedad”, realizada in vivo, el tratamiento EHA de ajo (*Allium sativum*) a una concentración de 1.000 ppm (T1), demostró proteger a la mazorca de este hongo fitopatógeno estudiado, de la misma manera que el tratamiento EHA de orégano (*Origanum vulgare* L.) en concentración de 1.000 ppm (T2) sin embargo, estadísticamente los tratamientos no exhibieron diferencias significativas.

Estos descubrimientos subrayan el gran potencial de los extractos hidroalcohólicos (EHA) de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare* L.), considerándolos como agentes antifúngicos de origen vegetal. El empleo de los extractos botánicos de ajo y orégano contribuye con el sector cacaotero proporcionando compuestos bioactivos sostenibles, sustentables y ecológicos. Esto implica que podría existir posibles ventajas económicas y aplicativas significativas, debido a su eficacia en concentraciones muy bajas.

Referencias

1. Abad, A., Acuña, C., & Naranjo, E. (2020). El cacao en la Costa ecuatoriana: estudio de su dimensión cultural y económica. *Estudios de la Gestión.*, 60-70. Obtenido de <https://doi.org/10.32719/25506641.2020.7.3>
2. Ali, S., & Shao, J. (2017). *Phytophthora megakarya* and *P. palmivora*, Causal Agents of Black Pod Rot, Induce Similar Plant Defense Responses Late during Infection of Susceptible Cacao Pods. *Frontiers in Plant Science*, 1-18. Obtenido de <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00169>

3. Álvarez, J. C., & Martínez, S. C. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 388-397. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
4. Ayala, M. (2016). Manejo Integrado de Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el Cultivo de Cacao (*Theobroma cacao* L.) Mediante el Uso de Fungicidas, Combinado con Labores Culturales. Guayaquil: Espol. Obtenido de <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/31859>
5. Báez, M. (2021). Actividad antioxidante y antiinflamatoria en extractos hidroalcohólicos de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 50(1), 85-95. Obtenido de <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v50n1.95450>
6. Correa, J. (2014). Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta Agronómica*, 388-399. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v63n4.42747>
7. Dubón, A. L., Alarcón, M., & León, M. D. (2021). Incidencia de hongos fitopatógenos y benéficos en plantaciones de cacao de Alta Verapaz, Guatemala. *Revista UVG*, 10-14. Obtenido de <https://doi.org/10.32719/25506641.2020.7.3>
8. Hobbelen, P. (2014). The Emergence of Resistance to Fungicides. *PLoS ONE*, 9(3). Obtenido de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091910>
9. Isman, M. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol*, 45-66. Obtenido de [10.1146/annurev.ento.51.110104.151146](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146)
10. Juárez-Segovia, K. (2019). EFECTO DE EXTRACTOS CRUDOS DE AJO (*Allium sativum*) SOBRE EL DESARROLLO in vitro DE *Aspergillus parasiticus* Y *Aspergillus niger*. *Polibotánica*, 47(24), 107-109. Obtenido de <https://doi.org/10.18387/polibotanica.47.8>
11. Mejía, L., Rojas, E., & Maynard, Z. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46(1), 4-14. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.012>

12. Mesa, M. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45(1), 23-30. Obtenido de <https://hdl.handle.net/10495/30774>
13. Mora, A. (2021). Uso de diferentes dosis de extractos etanólicos de ajo para control de moniliasis (*moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao. Machala: Machala: Universidad Técnica de Machala. Obtenido de <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/16558>
14. Murillo, J. J. (2022). Aislamiento y caracterización del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif) H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny. (1978). de frutos de *Theobroma cacao* L. *Revista Torreón Universitario*, 11(32), 1-32. Obtenido de <https://doi.org/10.5377/rtu.v11i32.14980>
15. Pabón, B. (2023). Efectos Antifúngicos de Extractos Botánicos sobre el Crecimiento Micelial de *Colletotrichum* sp. a Nivel In Vitro, Causante de Antracnosis en la Fruta de Aguacate. *Digital Publisher*, 9(1), 869-879. Obtenido de doi.org/10.33386/593dp.2024.1.2218
16. Pérez, O. A., & Cevallos, H. A. (2021). Análisis comparativo del impacto económico del cultivo del cacao en Ecuador del primer semestre 2019 versus el primer semestre 2020. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 171. Obtenido de <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/390/410>
17. Ramírez, S., Báez, O. L., Guzmán, T., Munguía, S., & Espinosa, S. (2011). Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et á. *Tecnología en Marcha*, 24(2), 3-17. Obtenido de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/137
18. Salous, A. E., Marcillo, J., & Vargas, J. A. (2020). Mejoramiento de la calidad del cultivo de cacao en Ecuador. *Revista Venezolana de Gerencia*, 25(3), 368-380. Obtenido de <https://doi.org/10.37960/rvg.v25i3.33375>
19. Suarez, Y. J., & Hernández., F. A. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Colombia.*, 30-90. Obtenido de <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12699>

20. Tarqui, O. (2017). Selección de genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) con resistencia a escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*) en Los Ríos, Ecuador. *Ciencias Agrarias*, 10(1), 17-26.
21. Tirado-Gallego, P. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Corpoica Ciencia Tecnológica Agropecuaria*, 17(3), 417-430. Obtenido de http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:517
22. Vélez, L. S. (2022). Recursos genéticos de cacao tipo Nacional en Ecuador: una revisión sistemática. *Ciencias Agrarias*, 15(2), 30-42. Obtenido de <https://doi.org/10.18779/cyt.v15i2.582>

© 2024 por los autores. Este artículo es de acceso abierto y distribuido según los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0) (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).