

Extractos de *Thymus vulgaris* y *Heliotropium indicum* sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler en cacao (*Theobroma cacao* L.)

Extracts from Thymus vulgaris and Heliotropium indicum on in vitro growth of the Phytophthora palmivora (Butler) Butler of cocoa (Theobroma cacao L.)

Orlando López-Báez¹
Sandra I. Ramírez-González¹
Martha Ramírez-González²
Omar González-Mejía¹
Saúl Espinosa-Zaragoza³
Juan M. Villarreal-Fuentes³

RESUMEN

A nivel mundial, el mercado de productos orgánicos está en aumento y el cacao no escapa a esta tendencia; desafortunadamente, los problemas sanitarios constituyen una fuerte limitante en la producción de este cultivo; la enfermedad mancha negra causada por el hongo *Phytophthora* es uno de los principales problemas a nivel mundial y nacional. Existen pocas alternativas para el manejo orgánico de esta enfermedad, es por ello que el presente trabajo se orientó a determinar el efecto antifúngico *in vitro* de extractos de *Thymus vulgaris* y *Heliotropium indicum* sobre *Phytophthora palmivora*, para lo cual se evaluaron cuatro formas de obtención de extractos (hidrolato, presurizado, fermentación aeróbica y anaeróbica), se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) con base en el crecimiento y producción de zoosporas del hongo. De un total de ocho extractos evaluados a concentración del 50%, cuatro inhibieron totalmente el crecimiento del patógeno; cuatro extractos presentaron un efecto antiesporulante, ya que inhibieron en diferentes porcentajes la esporulación aunque permitieron cierto crecimiento micelial. La CMI con efectos antifúngicos sobre *P. palmivora* de extractos de *H. indicum* en hidrolato fue del 40%, mientras que para el fermentado anaeróbico fue del 10%; y para *T. vulgaris* en hidrolato fue del 30% (V/V) y en el fermentado aeróbico fue del 50% (V/V).

Palabras clave: mancha negra, bioplaguicidas, alelopatía, agricultura orgánica, control de patógenos.

ABSTRACT

The market of organic products is increasing and cocoa is in this trend; unfortunately the sanitary problems constitute constraints in the production of this crop; the black pod disease caused by the fungus *Phytophthora* is one of the main problems worldwide. There are few alternatives for the organic management of this disease in the cocoa plantations, for this reason the present study was aimed to determining the *in vitro* antifungal effect of extracts from *Thymus vulgaris* and *Heliotropium indicum* on *Phytophthora palmivora*. The extracts were obtained by hydroalcoholic distillation, pressurization, aerobic and anaerobic fermentation and then evaluated. The minimum inhibitory concentration (MIC) based on growth and production of zoospores of the fungus was calculated. A total of eight extracts were evaluated at concentration of 50%; four of them caused a total inhibition in the growth of the pathogen mycelium; four inhibited the sporulation at different rates but allowed some mycelial growth. CMI antifungal effect on *P. palmivora* extracts of *H. indicum* in distillate was 40%, while for the anaerobic fermentation it was 10%, for *Th. vulgaris* in distillate it was 30% (V/V) and for the aerobic fermentation it was 50% (V/V).

Key words: black pod, biopesticides, allelopathy, organic agriculture, control of pathogens.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades constituyen uno de los más graves problemas sanitarios que afectan la producción de cacao a nivel mundial; la mancha negra causada por el complejo del hongo *Phytophthora* es considerada la más importante, ya que se encuentra diseminada en todas las regiones donde se produce el cacao (Evans, 2007; Guest, 2007; Ortiz, 2004). La enfermedad causa daños a los frutos de todas las edades, ataca los tejidos del tronco, las raíces, las hojas y los re-

nuevos. Las pérdidas que puede ocasionar esta enfermedad varía entre países y de año a año, se estima que a nivel mundial las pérdidas están entre 40 y 50% de la producción; en el caso de México, dependiendo de las regiones productoras de los estados de Chiapas y Tabasco, éstas oscilan entre 40 y 80% (Suárez, 1979; López, Delgado et al., 1996; Córdova et al., 2001; López et al., 2002; Castillo, 2003; Ortiz, 2004).

El principal método de control de esta enfermedad se ha basado en el uso de fungicidas convencionales, aunque este método ha venido

¹ Universidad Autónoma de Chiapas. Agencia Universitaria para el Desarrollo del Cacao-chocolate. Correo-e: olopez@unach.mx

² Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias. Grupo de Investigación en Química de Alimentos. Tunja, Boyacá, Colombia.

³ Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas, Entronque Carretera Costera y Pueblo de Huehuetán, Huehuetán, Chiapas. C.P. 30660.

perdiendo eficacia para el control de la misma (Enríquez, 2003), debido principalmente a los costos de los tratamientos y a que el hongo ha generado cepas resistentes.

En campo, la enfermedad de la mancha negra presenta dos fases: una de sobrevivencia y otra epidémica cuando la plantación está en fructificación, López et al. (2002) mencionan que es necesaria la integración de diversas prácticas que deben estar orientadas a la reducción del inóculo primario, a la disminución de las condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad y a la protección de los frutos formados. De esta manera se han integrado estrategias de implementación de prácticas agronómicas como la regulación de la sombra, la poda del árbol de cacao, la identificación y monitoreo de árboles foco en los que se inicia la epidemia y la eliminación de los frutos enfermos; el uso de germoplasma resistente y la protección de los frutos mediante aspersiones de fungicidas, sean convencionales u orgánicos (Mejía et al., 2000; López, et al., 2002; Enríquez, 2003; Iwaro et al., 2006; Pinzón et al., 2008).

Una alternativa potencial para el manejo de esta enfermedad es el uso de extractos vegetales, que en diversas investigaciones revelan un efecto positivo sobre el control de hongos fitopatógenos (Zavaleta-Mejía, 1999; Ramírez y López, 2006; Mendoza et al., 2007).

La importancia de las plantas para la producción de fungicidas e insecticidas se debe a que contienen principios activos en alguno de sus órganos, los cuales, extraídos en forma adecuada y administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos que permiten el manejo de microorganismos fitopatógenos y de insectos –plaga en los cultivos–. De acuerdo con Ramírez (2006), una alternativa de elaboración de extractos es la utilización de técnicas simples y fácilmente reproducibles por los productores elaborándolos a partir de especies vegetales procedentes preferiblemente del mismo agroecosistema, para facilitar su consecución y hacerlo más económico.

El uso de extractos vegetales y de compuestos minerales presenta una serie de ventajas para el manejo de problemas fitosanitarios (Zavaleta-Mejía, 1999; Ramírez y López, 2006) y además, están considerados dentro de las tecnologías aceptadas en los sistemas de producción orgánica (IFOAM, 2006), a la fecha existen diversos reportes que demuestran el potencial

de los extractos de plantas en el manejo de problemas fitosanitarios ocasionados por hongos. Ramírez (2008) encontró, mediante un estudio, el potencial de uso de diferentes plantas utilizadas en comunidades de productores de cacao y algunas presentes dentro del agroecosistema cacao, que tienen efecto regulador a enfermedades, entre las que se destaca *Heliotropium indicum* y *Thymus vulgaris*.

Dado el interés mundial por el consumo de productos orgánicos, existe un mercado de estos productos en plena expansión; en el caso del cacao, las cosechas producidas en sistemas orgánicos no alcanzan a satisfacer las demandas, lo que representa una gran oportunidad para los países productores, dadas las ventajas económicas, ambientales y sociales de este sistema de producción. Sin embargo, las enfermedades significan un enorme desafío para la cacaocultura, por lo que se considera necesario desarrollar tecnologías para el manejo de este grave problema fitosanitario (Mejía et al., 2000; Mendoza et al., 2007; IFOAM, 2006; Guest, 2007; Urdaneta y Delgado, 2007; Iwaro et al., 2006).

Bajo estas consideraciones, este trabajo se orientó al estudio del potencial que presentan los extractos de *Heliotropium indicum* y *Thymus vulgaris* sobre la inhibición del crecimiento y formación de zoosporas de *P. palmivora*, como una alternativa de manejo de la mancha negra del cacao en plantaciones bajo sistemas de producción orgánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Chiapas en Huehuetán, Chiapas; México. La recolección de material vegetal de ramas de alacrana (*Heliotropium indicum*) se realizó en el ejido Hidalgo, del municipio de Tapachula, y el tomillo (*Thymus vulgaris*) fue adquirido en el mercado local; el material fue limpiado y picado finamente.

Preparación de extractos. Los extractos fueron preparados en forma de hidrolato, presurizado, fermentación aeróbica y anaeróbica, utilizando 200 g de material verde por litro de solvente. La presurización es un proceso que consiste en someter el material vegetal fresco a un proceso de calentamiento y presión, para lo cual se emplea una olla de presión hermética.

camente tapada. Posteriormente se deja enfriar el extracto dentro de la olla tapada y se filtra en condiciones de asepsia para ser utilizado.

El hidrolato por destilación es un proceso en el que el material vegetal fresco es picado y colocado dentro de la marmita de un destilador junto con el solvente, se tapa herméticamente para hacer el proceso de extracción continuo mediante la aplicación de calor y presión constante, el vapor es conducido a un condensador y mediante enfriamiento con agua se obtiene el hidrolato.

Para la fermentación aeróbica se colocó el material vegetal picado en un matraz Erlenmeyer, se le agregó agua destilada estéril, y se cubrió con una gasa estéril y una liga. La mezcla se agitó todos los días por un período de 15 días para oxigenar y fermentar adecuadamente. Posterior a este período se filtró. Todo el procedimiento se realizó dentro de la cámara de flujo laminar.

Para la fermentación anaeróbica se colocó el material vegetal picado en matraz Erlenmeyer y se le agregó agua destilada estéril y se cerró colocándole una válvula de seguridad para salida de gases. El proceso de fermentación se realizó por un período de 15 días, y se filtró en condiciones estériles para su posterior uso.

Aislamiento del hongo *P. palmivora*. Se aisló de frutos enfermos procedentes del ejido Hidalgo, del municipio de Tapachula. El medio de cultivo empleado fue agar, jugo de ocho verduras (V8) y jugo de la cáscara del fruto de cacao, depositado en cajas de Petri de plástico estéril y sobre el cual se cultivó y multiplicó el hongo; las condiciones de cultivo fueron 23 °C +/- 2 °C y en oscuridad.

Bioensayos. Se realizaron dos tipos de bioensayos; en el primero los extractos fueron añadidos al medio de cultivo a una concentración del 50% (V/V). Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a una presión de 15 lb/cm² y a 121 °C y vaciados en cajas de Petri en las cuales se realizó la siembra del patógeno.

El primer bioensayo comprendió ocho tratamientos y dos testigos, uno absoluto inoculando el patógeno únicamente en un medio de cultivo original sin ningún control, y otro medio conteniendo polisulfuro de calcio, fungicida de tipo orgánico.

A partir de los resultados obtenidos en el primer ensayo, se realizaron dos ensayos más, a partir de los extractos que presentaron inhibición total del crecimiento del patógeno al 50%

(V/V), y evaluados a concentraciones de 40, 30, 20 y 10% V/V, con el fin de determinar la dosis mínima inhibitoria para los extractos de cada especie vegetal. En estos bioensayos se evaluaron ocho tratamientos en cada uno y se incluyeron también los dos tratamientos testigo.

En los tres ensayos, los tratamientos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones cada uno; la unidad experimental fue una caja de Petri. Cada 24 h se realizaron lecturas del crecimiento en mm del micelio del hongo, esta variable fue cuantificada durante 12 días. Posteriormente se realizó el conteo de zoosporas/mL empleando una cámara de Neubauer mediante un raspado del micelio del hongo.

Para determinar los efectos de los tratamientos estudiados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y en caso de detección de diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de Tukey al 1%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo 1

El potencial antifúngico de los extractos de alacrana (*H. indicum*) y tomillo (*T. vulgaris*) evaluados a concentración del 50% (V/V) sobre el crecimiento micelial y formación de zoosporas de *P. palmivora* (Cuadro 1), muestra que los extractos de tomillo en forma de hidrolato y fermentado aeróbico y anaeróbico, así como el hidrolato y fermentado anaeróbico de alacrana inhibieron completamente el crecimiento y producción de zoosporas del hongo.

Los extractos obtenidos por fermentación anaeróbica y el presurizado de tomillo mostraron efectos de inhibición parcial; en los demás tratamientos el hongo mantuvo el mismo crecimiento que en el testigo absoluto. El Análisis de varianza indicó diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Con respecto a la formación de zoosporas se aprecia, como todas las formas de obtención de las dos plantas ejercen acción de inhibición entre 100 y 58%, la presencia de este tipo de estructuras al ser comparado con el testigo absoluto que registró 6.1 x 10⁶ zoosporas/mL. El análisis de varianza practicado indica diferencias altamente significativas entre los tratamientos y la Prueba de Rango Múltiple de Tukey (P<0.01), que registra diferencias estadísticas de tomillo en fermentación aeróbica, presurizado e hidro-

Cuadro 1. Efectos de extractos de *Heliotropium indicum* y *Thymus vulgaris* en concentración del 50% (v/v) sobre el crecimiento micelial y formación de zoosporas de *P. palmivora*

Tratamiento	Crecimiento micelial mm	Zoosporas/mL x105
Testigo absoluto	50 ^a	62.65 ^a
Presurizado de alacrana	50 ^a	7.99 ^d
Fermentado aeróbico de alacrana	50 ^a	11.64 ^c
Presurizado de tomillo	50 ^a	3.97 ^e
Fermentado anaeróbico de tomillo	14.4 ^c	23.64 ^b
Fermentado aeróbico de tomillo	0 ^d	0 ^e
Hidrolato de tomillo	0 ^d	0 ^e
Fermentado anaeróbico de alacrana	0 ^d	0 ^e
Hidrolato de alacrana	0 ^d	0 ^e
Testigo fungicida orgánico	0 ^d	0 ^e

Nota: En cada columna, cifras agrupadas con la misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tuckey (P<0.05).

lato, y con alacrana en fermentado anaeróbico e hidrolato y el testigo químico con los demás tratamientos, incluyendo el testigo absoluto el cual registró el mayor valor en producción de zoosporas (Cuadro 1).

Bioensayo: Determinación de la concentración mínima inhibitoria

En el Cuadro 2 se presenta el efecto de los extractos de tomillo *Thymus vulgaris* en concentraciones del 40%, 30%, 20% y 10%, observados sobre el crecimiento micelial y formación de zoosporas de *P. palmivora*.

El análisis de varianza realizado a los datos obtenidos indicó diferencias altamente significativas entre los tratamientos. El hidrolato de tomillo al 40 y 30% inhibe completamente la formación de micelio y de zoosporas; al 20%

se cuantificó un efecto parcial de inhibición ya que el hongo presenta cierto crecimiento y la producción de zoosporas, aunque estos valores resultaron inferiores al testigo absoluto.

Con respecto a la fermentación aeróbica se presentó crecimiento en las cuatro concentraciones, siendo las concentraciones de 10 y 20% las que se comportaron igual que el testigo absoluto, y no registraron diferencias estadísticas.

El hidrolato de tomillo en las concentraciones de 40 y 30%, al no permitir crecimiento no se registran datos de formación de zoosporas, mientras que las concentraciones de 20 y 10% inhibieron la producción de estas estructuras en 98.72 y 95.12%, respectivamente. Para el extracto de tomillo obtenido por fermentación aeróbica, en las cuatro concentraciones evaluadas el hongo produjo zoosporas. El testigo absoluto registró 1.296 x 10⁷ zoosporas/mL. El análisis

Cuadro 2. Efecto de concentraciones de extractos de tomillo *Thymus vulgaris* sobre el crecimiento micelial y formación de zoosporas de *P. palmivora*

Tratamiento	Crecimiento micelial mm	Zoosporas/mL x105
Fermentado aeróbico de tomillo 20%	50.0 ^a	144.81 ^a
Fermentado aeróbico de tomillo 10%	50.0 ^a	75.64 ^b
Testigo absoluto	50.0 ^a	129.65 ^a
Hidrolato de tomillo 10%	35.8 ^{ab}	6.32 ^c
Fermentado aeróbico de tomillo 30%	31.6 ^b	81.99 ^b
Fermentado aeróbico de tomillo 40%	27.6 ^{bc}	86.81 ^b
Hidrolato de tomillo 20%	17.2 ^c	1.60 ^d
Hidrolato de tomillo 30%	0 ^d	0 ^e
Hidrolato de tomillo 40%	0 ^d	0 ^e
Testigo fungicida orgánico	0 ^d	0 ^e

Nota: En cada columna, cifras agrupadas con la misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tuckey (P<0.05).

de varianza indica diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Cuadro 2).

Con respecto a los extractos de alacrana en hidrolato y fermentación anaeróbica, el análisis de varianza indicó diferencias altamente significativas entre los tratamientos para las dos variables evaluadas. El hidrolato solo a la concentración del 40% inhibió completamente el crecimiento del hongo; mientras que el fermentado anaeróbico en las cuatro concentraciones mostró efectos de inhibición total. La Prueba de Rango Múltiple de Tukey ($P < 0.01$), muestra diferencias estadísticas entre las cuatro concentraciones del fermentado anaeróbico de alacrana y su hidrolato al 40% y el testigo químico con los demás tratamientos (Cuadro 3).

Con respecto a alacrana en hidrolato, las concentraciones de 40, 30, 20 y 10% presentaron inhibición en la formación de zoosporas con 100, 93.1, 74.9 y 34.8%, respectivamente, con respecto al testigo absoluto. El fermentado anaeróbico, al no permitir la formación de micelio, tampoco se presentó la producción de zoosporas (Cuadro 3).

Anualmente, una tercera parte de la producción mundial de cacao se ve destruida por las enfermedades que afectan al árbol y a los frutos de cacao (Evans, 2007; Ortiz, 2004). La mancha negra causada por *P. palmivora* es la enfermedad más difundida y la que mayores daños económicos causa en el mundo en las áreas caoteras. El patógeno ataca principalmente a los frutos, tallos, raíces y hojas de brotes tiernos. Se ha observado que sus ataques son más severos cuando hay descensos bruscos de temperatura y una alta humedad relativa en las plantaciones.

Tradicionalmente, el manejo de esta enfermedad se basa en la aplicación de aspersiones de fungicidas. Sin embargo, el uso continuo e indiscriminado de estos agroquímicos ha ocasionado el encarecimiento de los costos de producción, enfermedades por intoxicación en humanos y la contaminación al medio ambiente. Son responsables, además, de la destrucción de parásitos, biocontroladores naturales, entre otros tantos integrantes del agroecosistema (López y Ramírez, 2006).

Los programas de mejoramiento genético implementados en diversos centros de investigación orientados a la búsqueda de resistencia a *Phytophthora* han dado resultados parciales, se ha detectado la existencia de material resistente, en particular en el tipo genético Forastero (Iwano et al., 2006), también se ha determinado que esta resistencia es de naturaleza poligénica y horizontal (Thevenin et al., 2005); sin embargo, en la práctica el cultivo de material resistente ha resultado un éxito parcial y aún es necesaria la protección de los frutos mediante fungicidas para prevenir el daño por la enfermedad. Además, en la mayoría de los casos los genotipos resistentes no son de alta producción ni presentan alta calidad de semilla.

Tomando en cuenta la severidad creciente de los problemas ocasionados por la dispersión de las enfermedades en América Central y del Sur, y el mercado creciente de consumidores de productos orgánicos derivados del cacao, a nivel internacional se ha despertado el interés en desarrollar estrategias para el manejo eficiente y ecológico de las enfermedades que afectan este cultivo. Dentro de estas innovaciones se ha

Cuadro 3. Efecto de concentraciones de extractos de alacrana *Heliotropium indicum* sobre el crecimiento micelial y formación de zoosporas de *P. palmivora*

Tratamiento	Crecimiento micelial mm	Zoosporas/mL x105
Testigo absoluto	50 ^a	129,65 ^a
Hidrolato de alacrana 10%	50 ^a	84,51 ^b
Hidrolato de alacrana 20%	50 ^a	32,48 ^c
Hidrolato de alacrana 30%	28 ^b	8,98 ^d
Fermentado anaeróbico de alacrana 40%	0 ^c	0 ^e
Fermentado anaeróbico de alacrana 30%	0 ^c	0 ^e
Fermentado anaeróbico de alacrana 20%	0 ^c	0 ^e
Fermentado anaeróbico de alacrana 10%	0 ^c	0 ^e
Hidrolato de alacrana 40%	0 ^c	0 ^e
Testigo fungicida orgánico	0 ^c	0 ^e

Nota: En cada columna, cifras agrupadas con la misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tuckey ($P < 0.05$).

ensayado el uso del control biológico mediante microorganismos como *Trichoderma* (Bastos, 2007), *Beauveria bassiana* (Mahot et al., 2007) y *Bacillus* (Melnick et al., 2007), que han mostrado su capacidad in vitro para suprimir el crecimiento de organismos antagonistas a *T. cacao*. Pruebas del efecto supresorio de extractos de diversas plantas sobre *Phytophthora* han sido reportadas por Ramírez y López (2006) y Mendoza et al. (2007).

Numerosas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra hongos fitopatógenos (Ramírez, 2006). Las plantas seleccionadas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como fungicidas naturales deben ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción. Los resultados de esta investigación muestran el efecto supresorio que tiene el tomillo sobre *P. palmivora*, ya que el fermentado aeróbico y el hidrolato inhibieron completamente su crecimiento y el presurizado y fermentado anaeróbico, a pesar de que permitieron el crecimiento del patógeno, inhibieron la formación de zoosporas entre 62 y 93%, resultados que coinciden con los reportados por Hersch-Martínez et al. (2005), quienes mencionan que *T. vulgaris* posee actividad antimicrobiana y efecto antibacteriano sobre un amplio grupo de bacterias tanto gram positivas como negativas. Así mismo, reportan el efecto inhibitorio de *T. vulgaris* sobre aislamientos de tres hongos: *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*, procedentes de alimentos, y encontró alta efectividad y prevención en la formación de conidias y crecimiento de los tres hongos.

Hersch-Martínez et al. (2005) mencionan que *T. vulgaris* posee efecto antibacteriano sobre un amplio grupo de bacterias debido a que compuestos como el timol, p-cimene y limonene se encuentran en concentraciones de 39.7%, 30.0% y 1.7%, respectivamente. El timol, presente en la fracción de aceite esencial, es considerado como el principal compuesto con actividad antimicrobiana de muchas plantas, entre ellas el tomillo.

Compuestos con estructuras fenólicas como el timol son considerados con actividad antimicrobiana más fuerte que otros metabolitos secundarios como los triterpenos, esto es debido a la presencia de un grupo hidroxilo en la estructura fenólica (Busquet et al., 2005). Ellos sugirieron

que el carvacrol (que es un isómero del timol) actúa como un transportador transmembranal de cationes monovalentes por intercambio de los protones hidroxil (procedentes del grupo fenólico) por otros como el ión potasio similar al modo de acción de ionoforos. Estos eventos podrían resultar en la falta de fuerza móvil de un protón, consecuentemente un decremento en la síntesis de ATP y finalmente la célula muere, siendo esta la posible forma como actúan los extractos obtenidos del tomillo sobre *P. palmivora*.

Los resultados de este trabajo muestran que existe potencial de plantas con efectos biorreguladores que poseen metabolitos capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de *P. palmivora* pero es necesario, tal como lo mencionan Samprieto (2002), Hoss (1999) y Ramírez (2006), determinar la mejor forma de extracción para que aquellos metabolitos secundarios que poseen actividad y que generalmente se encuentran en bajas cantidades en las plantas, se puedan extraer en forma eficiente y que a dosis adecuadas permitan la regulación del crecimiento y desarrollo del patógeno.

Ramírez (2006) referencia que existen formas de extracción que ya han sido probadas con éxito como la infusión, extracción con alcohol y la fermentación y que en dependencia de la planta y de los metabolitos que posea son eficientes, esto coincide con los datos obtenidos en esta investigación que refieren a que para una misma planta se evidencia la existencia de formas de extracción más eficientes que otras, esto mismo ha sido reportado por varios autores (Velosa et al., 2003; Miño y Uricoechea, 2001; Gutiérrez et al., 2003; Ramírez y Ávila, 2002; Zavaleta-Mejía, 1999).

Los resultados mostrados son alentadores ya que se evidencia cómo con el uso de extractos de plantas se puede regular al patógeno *P. palmivora*, hongo que es de importancia mundial (Castillo, 2003; López et al., 2002; Ortiz, 2004; Suárez, 1979).

Estos resultados constituyen una alternativa de manejo que puede sumarse a las reportadas por López et al. (2002), quienes mencionan que la integración de diversas prácticas constituyen el sistema más eficiente para reducir los daños causados por *P. palmivora* y que estaría dentro de las acciones permitidas para el manejo orgánico de enfermedades (Enríquez, 2003; Ramírez y López, 2006).

Los fungicidas formulados a partir de extractos de plantas presentan la gran ventaja de

ser compatibles y fácilmente integrables a otras opciones para el manejo de enfermedades, lo que aumenta enormemente sus posibilidades de utilización con éxito, por lo que la posibilidad de emplear extractos vegetales para el manejo de *P. palmivora* en cacao es una alternativa y un avance en estrategias de control orgánico, ya que éstos se pueden obtener en cantidades suficientes para aplicaciones en plantaciones comerciales, con la consiguiente reducción en el uso de fungicidas de origen químico. Este es el primer estudio que muestra el potencial antifúngico de los extractos de alacrana *H. indicum* y tomillo *T. vulgaris* sobre *P. palmivora*.

Aunque será necesario desarrollar estudios orientados al perfeccionamiento de esta tecnología para su aprovechamiento por los productores de cacao, los resultados mostrados son alentadores y al mismo tiempo proponen perspectivas para continuar estudios orientados a la determinación del efecto antifúngico de extractos de plantas hacia otros patógenos, además de *Phytophthora*, causantes de enfermedades en *T. cacao*.

CONCLUSIONES

Los extractos de *T. vulgaris* y *H. indicum* poseen metabolitos capaces de inhibir el crecimiento y la producción de zoosporas in vitro de *P. palmivora*.

El efecto biorregulador de las plantas sobre *P. palmivora* depende de la forma de extracción y para cada una de ellas es diferente, ya que posiblemente contienen diferente tipo y cantidad de metabolitos; sin embargo, el hidrolato seguido de la fermentación anaeróbica parecen ser las formas más eficientes de extracción.

De un total de ocho extractos evaluados para el control de *P. palmivora* cuatro ejercieron inhibición total del patógeno y cuatro presentaron efecto antiesporulante, ya que inhibieron en diferentes porcentajes la esporulación pero permitieron el crecimiento micelial.

La concentración mínima con efectos antifúngicos sobre *P. palmivora* de extractos de *H. indicum* en hidrolato fue del 40%, mientras que para el fermentado anaeróbico fue del 10%; y para *T. vulgaris* en hidrolato fue del 30% (V/V) y en el fermentado aeróbico fue del 50% (V/V).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Fondo Mixto CONACYT-Gobierno del Estado de Chiapas, México, por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

- Álvarez, E., Grajales, C. y Villegas, J. (2002). Alternativa biológica para el control de mildew polvoso en rosa (*Sphaeroteca pañosa* var. *Ropsae*) mediante la aplicación de un lixiviado, producto de la descomposición del caquis de plátano, en: XXIII Congreso ASCOLFI. Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Bogotá, Colombia. Memorias: 40.
- Arciniegas, M., Riveros, A., Alba, S. y Loaiza, J. (2002). Evaluación preliminar del uso de extractos vegetales para el control de sigatoka negra *Mycosphaerella fijiensis*, en: XXIII Congreso ASCOLFI. Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Bogotá, Colombia. Memorias: 41.
- Barrera, N.L.L. (2008). Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (ENREB.:FR.) VUILL. Revista Mexicana de Fitopatología 26(1): 27-31.
- Bastos, C.N. (2007). Biological control of *Crinipellis perniciosa* by an isolate of *Trichoderma* sp, in: Akrofi, A. Y and Baah, F. (ed). Proceedings of INCOPEd 5th International Seminar, 15-17th Oct., 2006, San José, Costa Rica, pp. 1-7.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, C. Kamel. (2005). Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. Animal Feed Science and Technology.
- Castillo, P. (2003). Incidencia de la mancha negra (*Phytophthora palmivora*) en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en los sistemas de producción cacao-chalum y cacao-mamey en Tapachula, Chiapas. Tesis de Ingeniero agrónomo tropical. Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agrícolas, Campus IV. Huehuetán, México. 53 p.
- Córdova, V., Sánchez, M., Estrella, N., Sandoval, E. y Ortiz, C. (2001). Factores que afectan la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el ejido Francisco I. Madero del plan Chontalpa, Tabasco, México. Revista Universidad y Ciencia 17(34): 93-100.
- Corporación Colombia Internacional. (1999). Agricultura Ecológica. Talleres de Panamericana Formas e Impresos. 217 p.
- Enríquez, G.A. (2003). El cultivo orgánico de cacao bajo el concepto de calidad total. Estación Experimental Tropical Pichilingue, INIAP, Pichilingue, Ecuador. 27 p.
- Evans, H.C. 2007. Cacao Diseases-The Trilogy Revisited. Phytopathology 97 (12): 1640-1643.
- Gutiérrez, J., Agudelo, C., Ramírez, S. y Velosa, M. (2003). Control del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.) en el cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth) mediante la aplicación de extractos vegetales de ajo, canela y repollo en el municipio de Buenavista, Boyacá, en: XXIV Congreso ASCOLFI. Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Armenia, Quindío, Colombia. Memorias: 3.
- Hersch-Martinez, P., Leaños-Miranda, B.E. & Solorzano-Santos, F. (2005). Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. Fitoterapia 76:453-457.
- Hoss, R. (1999). Recursos botánicos con potencial biocida: conceptos básicos y métodos de análisis. Editorial Gráfica Stefany. Lima, Perú. 56 p.
- IFOAM. (2006). Manual de capacitación en agricultura orgánica para los trópicos. International Federation of Organic Agriculture Movements. Research Institute of Organic Agriculture. ISBN 3-934055-35-4.
- Iwaro, A.D., Butler, D.R. & Eskes, A.B. (2006). Sources of resistance to *Phytophthora* pod rot at the International Cocoa Genebank, Trinidad. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 99-109.

- López, A., Delgado, P., Núñez, V. y Azpeitia, A. (1996). Manejo y producción del cultivo de cacao en Tabasco. Gobierno del Estado de Tabasco. Instituto para el Desarrollo de Sistemas de Producción del Trópico Húmedo de Tabasco. Talleres Gráficos de Litografía Margarita, Villahermosa, Tabasco; México. 27 p.
- López, B.O., Ramírez, G.S.I., Ramírez, G.M., Moreno, B.G. y Alvarado, G.A. (ed). (2006). Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Primera edición, Editorial UPTC-UNACH, Tunja, Boyacá, Colombia. 427 p.
- López, B.O., Pinson, E.P. y Gutiérrez, C. L. (2002). Técnicas para el manejo orgánico de la mancha negra del cacao causada por *Phytophthora spp.* Universidad Autónoma de Chiapas. Campus IV. 18 p.
- Mahot, H., Babin, R., Dibog, L., Tondje, P.R. & Bilong, C. (2007). Biocontrol of cocoa mirid *Sahlbergella singularis* Hagl. (Hemiptera: Miridae) with *Beauveria bassiana* Vuillemin: First results of activities carried out at IRAD, Cameroon, in: Akrofi, A. Y and Baah, F. (ed). Proceedings of INCOPEP 5th International Seminar, 15-17th Oct., 2006, San Jose, Costa Rica. pp. 14.
- Melnick, R.L., Bailey, B.A., Maximova, S.N., Guiltinan1, M. J. & Backman, P. A. (2007). *Bacillus spp* as biological control agents of cacao disease, in: Akrofi, A. Y & Baah, F. (ed). Proceedings of INCOPEP 5th International Seminar, 15-17th Oct., 2006, San Jose, Costa Rica. pp. 62-69.
- Mejía, L., Argüello, A. y Castellanos, O. (2000). Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao. CORPOICA. Impresores Colombianos, Bucaramanga, Colombia. 144 p.
- Mendoza, C.B., Moreno, M.N., Weil, M. y Elango, F. (2007). Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. Tierra Tropical 3 (1):81-89.
- Miño, J. y Uricoechea, J. (2001). Evaluación de seis métodos farmacológicos de preparación de extractos de repollo (*Brassica oleraceae*), ajo (*Allium sativum*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) en el control de *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. en el cultivo de la mora (*Rubus glaucus*) en condiciones de laboratorio en Tunja, Boyacá. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 91 p.
- Niggli, U., Slabe, A., Schmid, O., Halberg, N. & Schlüter, M. (2008). Vision for an Organic Food and Farming Research Agenda to 2025 Organic Knowledge for the Future. IFOAM Regional Group European Union (IFOAM EU Group). Brussels, Belgium. International Society of Organic Agriculture Research (ISOFAR), Bonn, Germany. 45 p.
- Ortiz, G. (2004). Especies de *Phytophthora* responsables de la mancha negra del cacao en México y estrategias de su control, en: Simposio nacional de manejo fitosanitario de cultivos tropicales. Villahermosa, Tabasco; México. Memorias: 78-90.
- Pinzón, U.J.O., Rojas, A.J. y Rojas, F. (2008). Guía técnica para el cultivo del cacao. Federación Nacional de Cacaoteros, Colombia. Bogotá, Colombia. 189 p.
- PREVECAB. (1990). Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Programa de recursos vegetales del convenio Andrés Bello. Bogotá, Colombia. Talleres de Editora Guadalupe, pp. 158-257.
- Ramírez, M. (2006). Técnicas para la determinación de moléculas bioactivas de extractos de plantas para la formulación de bioplaguicidas, en: López, B.O. et al. (ed). 2006. Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Primera edición, Editorial UPTC-UNACH, Tunja, Boyacá, Colombia. 427 p.
- Ramírez, S. (2008). Extractos vegetales para el manejo orgánico de la mancha negra (*Phytophthora palmivora*) del cacao (*Theobroma cacao*). Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas; México. 92 p.
- Ramírez, O. y Ávila, C. (2002). Evaluación de hidrolatos en el control de *Sclerotium cepivorum*, *Ditylenchus dipsaci* y complejo amarillero (*Alternaria porri*, *Peronospora destructor* y *Stemphylium sp.*) en cebolla de bulbo (*Allium cepa*), en: XXIII Congreso ASCOLFI. Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Bogotá, Colombia. Memorias: 41.
- Ramírez, S. y López, O. (2006). Manejo orgánico integral de insectos plaga y de enfermedades en el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en México, en: López, B.O. et al. (ed). 2006. Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Primera edición, Editorial UPTC-UNACH, Tunja, Boyacá, Colombia. 427 p.
- Sampietro, A. (2002). Alelopatía: Concepto, características, metodología de estudio e importancia. Cátedra de fitoquímica. Instituto de estudios vegetales. Facultad de Bioquímica. Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina. 24 p.
- Sánchez, M. y Prager, M. (2001). Nociones fundamentales para el manejo ecológico de problemas fitosanitarios. Universidad Nacional de Colombia. Talleres Gráficos de Impresora Feriva. Cali, Colombia. 43 p.
- Suárez, C. (1979). Las enfermedades del cacao en Latinoamérica, en: 7ª. Conferencia internacional de investigación en cacao. Douala, Cameroun. Proceedings: 251-254.
- Thevenin, J.M., Umaharan, R., Surujdeo-Maharaj, S., Latchman, B., Cilas, C. & Butler, D. R. (2005). Relationships Between Black Pod and Witches'-Broom Diseases in *Theobroma cacao*. Phytopathology 95(1): 1301-1307.
- Urdaneta, G.L.M. y Delgado, A.A.E. (2007). Identificación de la microbiota del filoplano del cacaotero (*Theobroma cacao* L.): en el municipio Carraciolo Parra Olmedo, estado Mérida, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía-LUZ, Mar (Venezuela). 24(1): 47-68.
- Velosa, M., Ramírez, S., Miño, J., Uricoechea, J., Ramírez, J. y González, C. (2003). Manejo biológico de la pudrición del fruto (*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.) en la mora (*Rubus glaucus* Benth) en condiciones de laboratorio, en: XXIV Congreso ASCOLFI. Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines. Armenia, Quindío, Colombia. Memorias: 3-4.
- Zavaleta-Mejía, E. (1999). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. Terra Latinoamericana 17 (3):201-207.