

OPTIMIZACIÓN DE LA DESTILACIÓN
DE *ORIGANUM VULGARE* L,
CON EFECTO ANTIFÚNGICO EN
MONILIOPHTHORA RORERI
(CIF & PAR)

José Gregorio Joya Dávila¹, M.Sc. Álvaro Enrique Alvarado Gaona.²
1 josegregorio.joya@uptc.edu.co • 2 alvaro.alvarado@uptc.edu.co

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA

Dra. Sandra Isabel Ramírez González¹, Dr. Orlando López Báez²,
Dr. Saul Espinoza Zaragoza³
1 sandra.ramirez@unach.mx • 2 olopez@unach.mx • 3 saulez1@gmail.com

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

RESUMEN

Moniliophthora roreri (Cif. & Par), desde su ingreso a México en el 2005 (López *et al.*, 2006), disminuyó considerablemente la producción de grano de cacao seco, pasando de 43.974,52 en el 2004 a 22.405,01 ton al año 2010 (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2015). Este patógeno se convirtió en la principal amenaza para el productor cacaotero, siendo aún escasas las medidas para su manejo sostenible. El objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de extracción por destilación de *Origanum vulgare L.*, evaluando *In vitro* su efecto antifúngico; se obtuvieron ocho hidrodestilados, obtenidos con material fresco y seco al sol y dos solventes (agua: alcohol); mediante la técnica de cultivo en medio líquido en tubos de ensayo, que consistió de una solución de agua más extracto de cacao relación (1:1 v/v) a la cual se adicionaron conidias del hongo. A esta solución, se adicionó el hidrodestilado de *O. vulgare L.* en relación (1:1 v/v), determinando su efecto sobre la formación y germinación de conidias del hongo en cinco momentos de observación (0, 24, 48, 72 y 96 horas). Los resultados muestran que todos los hidrodestilados de *O. vulgare L.*, presentan metabolitos con efectos de inhibición sobre las variables evaluadas, siendo los mejores tratamientos control sobre la formación de conidias el O7 Y O3 (*O. vulgare* seco, 45 g L⁻¹ relación 10:0 agua: alcohol y *O. vulgare* fresco, 300 g L⁻¹ relación 10:0 agua: alcohol), alcanzando el 68,% a las 48 horas y 65,6% a las 72 horas, con respecto al testigo.

Palabras clave

Extractos vegetales, hidrolato, Theobroma cacao.

OPTIMIZACIÓN DE LA DESTILACIÓN *ORIGANUM VULGARE* L, WITH ANTIFUNGAL EFFECT IN *MONILIOPHTHORA RORERI* (CIF & PAR)

— Abstract—

Moniliophthora roreri (Cif & Par), since entering Mexico in 2005 (Lopez *et al.*, 2006) it significantly decreased grain production of dry cocoa, passing 43,974.52 to 22,405.01 ton of dry cocoa (Secretariat of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food [SAGARPA], 2015). This pathogen became the main threat for cocoa producer; the measures were still scarce for sustainable management. The objective of this work is to optimize the extraction process by distilling of *Origanum vulgare* L, by evaluating *in vitro* its antifungal effect; eight were obtained hidrodistillation, these were obtained with fresh and sun-dried material and two solvents (Water: Alcohol) by using the technique of liquid culture medium in test tubes, by consisting of a solution of more cocoa extract water ratio (1:1 v/v) to which they were added fungus conidia. To this solution is added the hydrodistillation of *O. vulgare* L. in relation (1: 1 v / v), by determining its effect on the formation and germination of conidia of the fungus in five observation times (0, 24, 48, 72 and 96 hours). The results show that all hydrodistillation *O. vulgare* L metabolites present with inhibitory effects on the variables evaluated, being the best treatments. It is the best treatments of control over the formation of conidia the O7 and O3 (*O. vulgare* L. dry, 45 g L⁻¹ water ratio 10.0: alcohol and fresh *O. vulgare* L., 300 g L⁻¹ ratio of 10: 0 water: Alcohol) the bests, by reaching 68.3% at 48 hours and 65.6% after 72 hours respectively, compared with the control.

Keywords

Plant extracts, hydrolate, Theobroma cacao.

La moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif & Par), es el principal problema en 11 países del continente americano entre ellos están México y Colombia (Phillips *et al.*, 2007; Sánchez y Garcés, 2012). Este patógeno en condiciones naturales ataca exclusivamente al fruto en cualquier etapa de desarrollo, siendo los frutos hasta tres meses de edad los más susceptibles (López, 2015). Entre los principales síntomas se presentan protuberancias o «gibas», puntos aceitosos, amarillamientos o maduración prematura y manchas chocolate (Merchán, 1980; Evans, 2002; Oliveira y Luz, 2005; López *et al.*, 2006). Ocasiona la pérdida total de sus semillas o disminución en su calidad organoléptica debido a la degradación que provoca en los tejidos (Ramírez, 2013).

En marzo del 2005, fue detectada por primera vez en plantaciones del municipio de Pichucalco en el estado de Chiapas - México (López *et al.*, 2006), dejando a su paso el derribo de gran número de hectáreas sembradas, abandono de plantaciones y bajas considerables de la producción (Ramírez, 2008a; Ramírez *et al.*, 2011a).

Originario de Colombia, en los departamentos de Santander y Antioquia (Phillips *et al.*, 2005; Phillips, 2006; Grisales y Afanador, 2007; Jaimes y Aranzazu, 2010), a la fecha se han encontrado cinco grupos genéticos del hongo (Phillips y Aime, 2005; Álvarez *et al.*, 2014), país donde ha sido devastador y las estrategias de control tradicional han generado resultados colaterales, como cambios en el organismo que llevan a la resistencia a fungicidas y mutaciones que han originado varias cepas en algunas regiones (Meinhardt y Rincones, 2008; Meinhardt *et al.*, 2014). El control de *M. roreri* mediante el uso de fungicidas de síntesis química ha sido ensayado en diversos lugares; pero, los resultados no son del todo efectivos para el manejo de esta enfermedad; además se cuestiona las altas frecuencias de aplicación, la contaminación que ocasionan y también su costo, pues a menudo resulta antieconómico para el cacaotero, a pesar de tener efecto en la disminución de la enfermedad (Meza y León, 1972; Suárez, 1979; Achicanoy y Buritica, 1981; González, 1982; Cruz, 1986; Martí *et al.*, 1987; Sánchez *et al.*, 2003).

Como parte de su metabolismo, las plantas poseen componentes a los que se les conoce como metabolitos secundarios y sus propiedades químicas se han investigado ampliamente desde mediados del siglo XIX (Vergara, 1997; Croteau *et al.*, 2000); encontrándose que pueden ser una herramienta útil para el control de plagas y enfermedades, con un potencial muy alto para manejar los principales problemas fitosanitarios que posee la producción agrícola (Hernández *et al.*, 2007; Barrera y Bautista, 2008).

En México se han realizado investigaciones con extractos de plantas encontrando gran diversidad de plantas (entre los que está el orégano (*Origanum vulgare* L.) con efecto inhibitorio sobre el crecimiento y desarrollo de patógenos entre ellos *Phytophthora* spp., *Colletotrichum gloeosporioides* y *Moniliophthora roreri*, (Ramírez y López, 2006; Ramírez, 2008b; Ramírez et al 2011a). El orégano y el jengibre han mostrado efecto sobre la inhibición de diversos tipos de bacterias y hongos que causan enfermedades en animales y en plantas de cultivo, tanto a nivel de campo como en la pos-cosecha (Bertelli et al., 2003; Nguefack et al., 2004; Kulisic et al., 2004; Nostro et al., 2004; Sahin et al., 2004; Sacchetti et al., 2005; Hersch et al., 2005).

Por lo que el objetivo de la presente investigación fue aportar nuevas alternativas amigables con el ambiente y eficaces en el manejo de *M. roreri*, considerando los reportes de Ramírez et al., (2011a), se pretendió optimizar el proceso de extracción por destilación de *Origanum vulgare* L., evaluando su capacidad antifúngica, sobre la formación y germinación de conidias de *M. roreri* (Cif y Par) aislado de mazorcas de cacao de plantaciones de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del patógeno: El hongo *M. roreri* fue multiplicado a partir de una cepa del hongo presente en el laboratorio de Agrotecnologías de la AUDES Cacao– Chocolate de la Universidad Autónoma de Chiapas, previamente aislado de muestras de frutos enfermos en estado de mancha, colectados en plantaciones de cacao del municipio de Comalcalco, del estado de Tabasco, México. Según metodología descrita por Ramírez y colaboradores (2011b).

Obtención de los hidrolatos: Los destilados fueron elaborados en el Laboratorio de Agrotecnologías de la AUDES Cacao- Chocolate, a partir de Orégano (*O. vulgare* L), se obtuvieron ocho hidrolatos los cuales se describen en el siguiente cuadro:

Cuadro I. Convenciones para los diferentes tratamientos.

Tratamientos.		Planta	Cantidad g L-1	Relación agua: alcohol
1	O ₁	Orégano Fresco	300	10:1
2	O ₂		600	10:1
3	O ₃		300	10:0
4	O ₄		600	10:0

5	O ₅	Orégano seco	45	10:1
6	O ₆		90	10:1
7	O ₇		45	10:0
8	O ₈		90	10:0
9	Testigo absoluto (Test. Abs) Agua destilada			

Para el proceso de extracción se colocó el material vegetal y el solvente respectivo en la marmita, y se sometió a calentamiento constante, hasta obtener el hidrodestilado en un equipo de acero inoxidable de destilación elaborado para tal fin.

Prueba en medio líquido en tubos de ensayo: Se utilizó la metodología descrita por Ramírez, (2011a) la cual permite determinar el número de conidias totales y el número de conidias germinadas en presencia de cada tratamiento.

Solución madre: Se tomaron cuatro cajas de Petri de 50 mm que contenían cultivo de *M. roreri* de 12 días de sembrado, se le realizó un raspado superficial del hongo y se lavó con 50 ml de agua destilada estéril, se agregaron en un Erlenmeyer y se le añadió 50 ml de extracto de cacao y una gota de tween 80.

Solución con hidrodestilado: La solución madre se dividió en seis tubos de ensayo: tres como testigo (con 5 ml de agua destilada + 5 ml de solución madre) y tres que contenían el hidrolato a analizar (5 ml del hidrodestilado + 5 ml de solución madre); luego se agitaron en vortex para homogenizar la mezcla y se realizaron las lecturas en la cámara de Neubauer, con tres repeticiones, contabilizando el número de conidias totales y el número de conidias germinadas. Los tubos con los tratamientos y sus respectivos testigos se incubaron en la oscuridad a 28°C +/- 2°C.

Variables: Las variables que se evaluaron fueron: formación de conidias totales y número de conidias germinadas a 0, 24, 48, 72 y 96 horas, Según metodología descrita por Ramírez (2013) y Ochoa (2015).

Diseño Experimental: Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con nueve tratamientos, tres repeticiones por tratamiento a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Se realizó un análisis de varianza y en caso de detectarse diferencias significativas se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey al 5%, usando el programa estadístico SPSS STATISTICS 2.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con el análisis estadístico, se observan diferencias significativas en el efecto de los tratamientos sobre la formación de conidias a las 24, 48, 72 y 96 horas, mientras que a las 0 horas no se presentaron diferencias significativas (Figura 1). A las 0 horas, el tratamiento con mayor formación de conidias correspondió al tratamiento O6 (material seco relación 10:1 agua: alcohol), con 211,11 conidias $\times 10^4$ ml⁻¹, y el tratamiento que presentó menor formación de estas estructuras fue O8 con 143,61 conidias $\times 10^4$ ml⁻¹ (Figura 1A). A las 24 horas, el tratamiento con mayor formación de conidias fue el testigo absoluto, presentando diferencias significativas con los demás tratamientos, donde el tratamiento O1 tuvo menor formación de estas estructuras, con 82,92 conidias $\times 10^4$ ml⁻¹, en donde todos los extractos inhibieron la formación de conidias en comparación al testigo (Figura 1B). A las 48 horas, el tratamiento testigo presentó diferencias significativas en relación a los demás tratamientos, siendo O3, el que presentó menor formación de conidias con 86,11 conidias $\times 10^4$ ml⁻¹, similar a O5 y O7, los dos últimos obtenidos a partir de material seco (Figura 1C). A las 72 horas, el testigo presentó mayor formación de conidias, en donde el tratamiento O7, fue el mejor comportamiento con 72,22 conidias $\times 10^4$ ml⁻¹ similar a O5 y O8 (Figura 1D). A las 96 horas, el tratamiento que mejor comportamiento presentó fue el O7, con 77,78 conidias $\times 10^4$ ml⁻¹, presentando diferencias significativas con el testigo (Figura 1E).

A partir de las 48 horas el tratamiento O7 fue el que presentó valores bajos en la formación de conidias, llegando a inhibir el 68,3 % a las 72 horas.

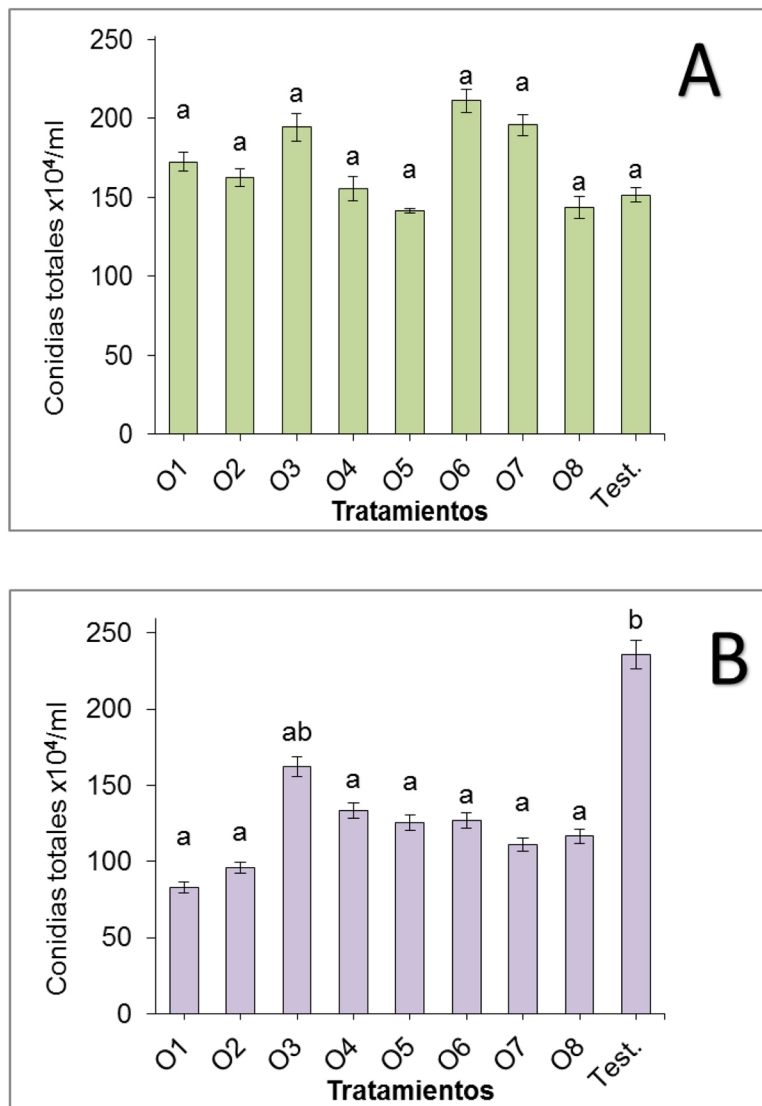
Los resultados obtenidos indican, que el hidrolato de orégano tiene efecto regulador de *M. roreri*, tal como lo reporta Ramírez (2013), sumándose a los reportes de actividades antibacterial y antioxidante, así como de tener efecto como un preservativo natural de alimentos (Hersch *et al.*, 2005; Kulisic *et al.*, 2004; Nostro *et al.*, 2004).

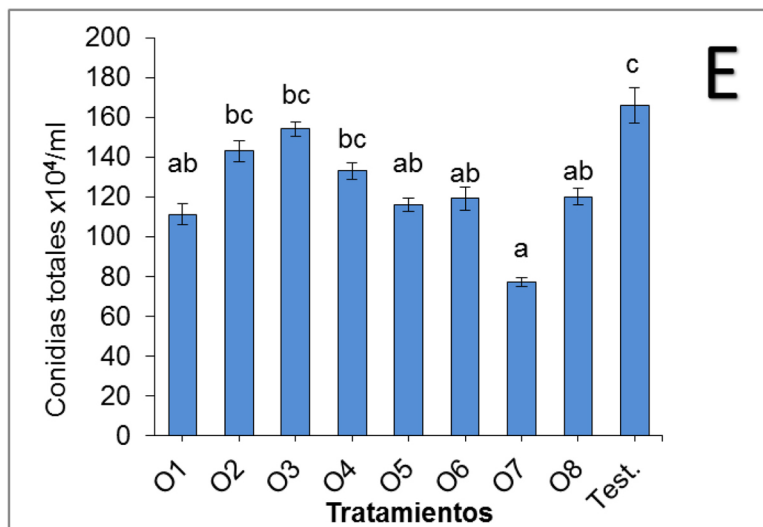
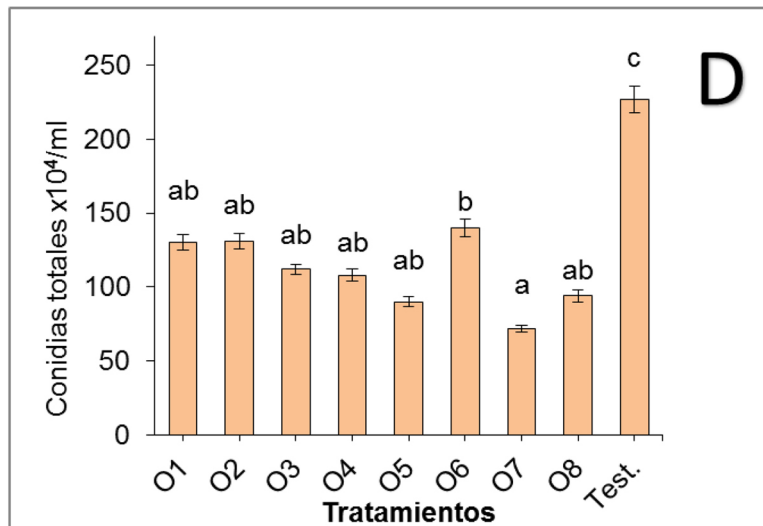
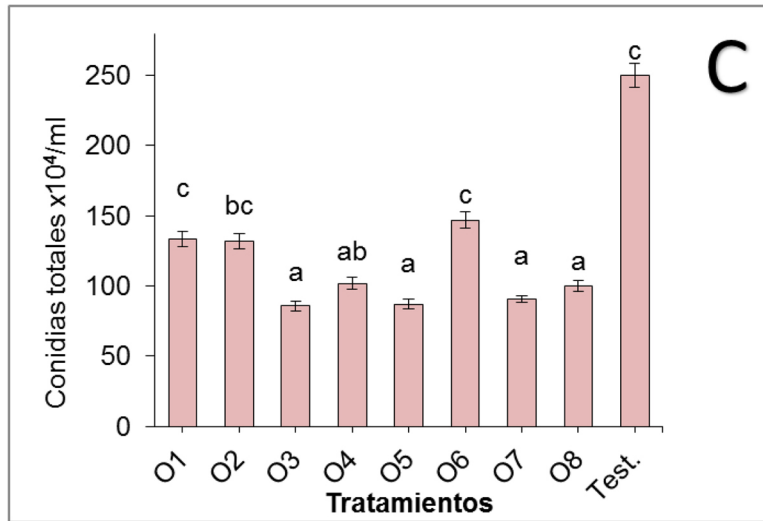
En cuanto a su actividad antimicrobiana, el resultado de la investigación confirma que el aceite esencial del orégano, posee múltiples efectos, entre ellos, antimicrobiano frente a bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias gram negativas (Albado *et al.*, 2001), además observándose una actividad antifúngica para la inhibición de la formación y germinación de conidias.

Según lo reportado por García *et al.*, (2006) los aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Origanum vulgare*) fueron evalua-

dos para determinar su actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. Ambos aceites presentaron actividad fungicida in vitro contra *A. flavus*, el aceite esencial de orégano a partir de 1000 ml. L⁻¹

Figura 1. Efecto de los extractos de orégano, sobre el número de conidias totales x10⁴ ml⁻¹. A: 0 horas. B: 24 horas. C: 48 horas. D: 72 horas. E: 96 horas. Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (P≤0.05)





Según Ramírez *et al.*, (2011a), la forma de extracción de *O. vulgare* ejerce influencia en la extracción de metabolitos activos, ya que el hidrolato presentó inhibición total del crecimiento y formación de conidias del patógeno. Por tanto, según Sahin *et al.*, (2004) menciona que el componente más importante del orégano es el aceite esencial, que contiene del 60 al 75% de fenoles volátiles, particularmente timol y carvacrol, los cuales tienen una estructura química similar (carvacrol naturalmente es un isómero de timol) y un efecto antimicrobiano.

Para la variable de germinación de conidias, ninguno de los tratamientos de orégano presentó diferencias estadísticas en todos los momentos de observación, a pesar de que a las 48 horas todos los tratamientos de orégano no presentaron conidias germinadas, el testigo absoluto (agua destilada) presentó 1,39 conidias germinadas $\times 10^4$ ml⁻¹.

CONCLUSIONES

Todos los tratamientos de orégano presentaron diferencias significativas respecto con el testigo (agua destilada) a partir de las 24 horas, inhibiendo en diferentes porcentajes la formación y germinación de conidias de *M. roreri*, pudiendo asociarse, a la producción de metabolitos secundarios que tienen efecto anti fúngico afectando la formación de estructuras que producen la moniliasis del cacao.

El tratamiento O7 (orégano seco, 45 g/L relación 10:0 agua: alcohol) fue el mejor hidrolato de los ocho evaluados presentando un efecto inhibitorio a partir de las 48 horas, el cual presentó los mejores niveles de control en la formación y germinación de conidias de *M. roreri* en el transcurso del tiempo con un porcentaje de inhibición del 68,3% a las 72 horas; por lo cual constituye una alternativa potencial para el manejo de la moniliasis del cacao, tanto para sistemas de producción convencional como orgánica.

REFERENCIAS

- Achicanoy, H.** y Buritica, P. (1981). Evaluación in vitro de fungicidas para el control de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer y *Moniliophthora roreri* (Cif&Par) Evans *et ál.*, In: 8ª. Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Cartagena, Colombia. Proceedings; 419-423.
- Albado, E;** Saez, G y Ataucusi, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Med Hered Lima*; 12(1).16-19.
- Álvarez, J.;** Martínez, S. y Coy J. (2014). Estado de la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en Colombia. *Acta agronómica.*; 63(4). 388-399.
- Barrera, L.** y Bautista, S. (2008). Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum octurnum* L. Sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología*; 26 (1):27-31.
- Bertelli, D.;** Plessi, M. & Miglietta, F. (2003). Effect of microwaves on volatile compounds in *origanum*. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*; 36(1): 555-560.
- Croteau, R.;** Kutchan, M. & Lewis, G. (2000). Natural products (secondary metabolites). In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (Editors). *American Society of Plant Physiologists*. Rockville, US. P; 1250-1318.
- Cruz Chang, C.** (1986). Evaluación de la remoción de frutos, la polinización artificial y la aplicación de fungicidas sobre la incidencia de la moniliasis y la producción de cacao. San José (Costa Rica). Colegio de Ingenieros Agrónomos de Costa Rica, S. J. R. Congreso Agronómico Nacional; 33. Congreso de la Sociedad Americana de Ciencias Hortícolas - Región Tropical.
- Evans, H.** (2002). Invasive Neotropical Pathogens of Tree Crops. *Tropical Mycology*; 2(1): 98-105.
- García, E.;** Quezada, M.; Moreno, J.; Sánchez, G.; Moreno E y Pérez, M. (2006). Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su Efecto sobre la Producción de Aflatoxinas en Nuez Pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24(1). 8-12.
- González, L.** (1982). Epifitiología y combate de la moniliasis del cacao. Universidad de Costa Rica. Facultad de Agronomía, San Pedro De Montes de Oca, Costa Rica. Informe anual de proyecto de investigación; p 21.
- Grisales, S.** y Afanador, L. (2007). Análisis de variabilidad genética en *Moniliophthora roreri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología.*; 9(2): 15-32.

- Hernández, A.;** Bautista, S. y Velázquez, M. (2007). Prospectiva extracto vegetales para controlar enfermedades en Poscosecha. *Rev. Fitc. Mex;* 30(2):119-123.
- Hersch, P.;** Leños, F. & Solórzano, S. (2005). Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. *Fitoterapia* 76 (1): 453-457.
- Jaimes, Y. y** Aranzazu, F. (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en Monilia (*Moniliophthora roreri*). In: Hoyos L.M. (ed.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Colombia. p. 90.
- Kulisic T.;** Radonic, A.; Katalinic, V. & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Foodchemistry;* 85(1): 633-640.
- López, O.;** González, O.; Ramírez, S.; Espinosa. S.; Moreno L.; Ruiz, C.; Villarreal J. y González, G. (2015). Comportamiento de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) en Tapachula, Chiapas, México. *Acta Agrícola Y Pecuaria,* 1(1): 16-23.
- López, O.;** González, O.; Ramírez, S.; Lee, V.; Ramírez, M.; Alvarado A. y Gehrke, M. (2006). Diagnóstico y técnicas para el manejo de la moniliasis del cacao. Universidad Autónoma de Chiapas; Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Impreso: Digital. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 40 p.
- Martí, J.;** Galindo, J.; Ramírez, C. y Enríquez, G. (1987). Evaluación del combate biológico y químico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica. In: 10^a. Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Santo Domingo, República Dominicana. Proceedings; 453-497.
- Meinhardt, L. &** Rincones, J. (2008). *Moniliophthora pernicios*a, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Mol. Plant. Pathol;* 9(5):577-588.
- Meinhardt, W.;** Costa, G.; Thomazella, P. & Teixeira, J. (2014). Genome and secretome analysis of the hemibio trophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics;* 15(1):164-176.
- Merchán, M.** (1980). Avances en la investigación de la moniliasis del cacao en Colombia. In: La moniliasis del cacao. Enríquez, G. (ed.). Compendio de los trabajos presentados en el Seminario llevado a cabo en el CATIE. Informe Técnico No. 28. Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza (CATIE), Costa Rica. Páginas 53-69.
- Meza, C. y** León, V. (1972). Control químico de la moniliasis y mancha de agua del cacao. *Revista de la Facultad de Agronomía (Venezuela);* 2(1): 17-29.

- Nguefack, J.; Leth, V.; Amvam, P. & Mathur, B. (2004).** Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. In: *International Journal of Food Microbiology*; 94(2): 329– 334.
- Nostro, A.; Blanco, .R.; Cannatelli, A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I.; et al. (2004).** Susceptibility of methicillin resistant taphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiology Letters.* ; 230: 191-195.
- Ochoa, L. (2015).** Preparados minerales en el manejo orgánico de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al.) DE *Theobroma cacao* L. En el municipio de Tecpatán, CHIAPAS – MÉXICO Tesis de Maestría, Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical, Universidad Autónoma de Chiapas Facultad de Ciencias Agrícolas Campus IV.
- Oliveira, M. y Luz, E. (2005).** Identificação e manejo das principais doenças do cacauero no Brasil. Ilhéus, CEPLAC/ CEPEC/SEFIT. 132 p.
- Phillips, W. (2006).** Origen, biogeografía, diversidad genética y afinidades taxonómicas del hongo *Moniliophthora roreri* (Cif) Evans et al., del cacao (*Theobroma cacao* L.) determinadas mediante evidencia molecular, fitopatológica y morfofisiológica. Recuperado el 23 de agosto de 2015. Disponible en: [www. Catie. ac.cr].
- Phillips, W.; Aime, C.; y Wilkinson, J. (2007).** Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathol*; 56 (1): 911-922.
- Phillips, W. y Aime, M. (2005).** The causal agents of 'witches' broom and frosty pod rot of cacao chocolate (*Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*;97(1):1012-1022.
- Phillips, W.; Castillo, J.; Krauss, U.; Rodriguez, E. y Wilkinson, J. (2005).** Evaluation of cacao (*Theobroma cacao*) clones against seven Colombian isolates of *Moniliophthora roreri* from four pathogen genetic groups. *Plant Pathology*; 54(1): 483-490.
- Ramírez S.; López O.; Guzmán T.; Munguía S. y Espinosa, S. (2011a).** Actividad Antifúngica in vitro de extractos de *Oreganum. vulgare* L., *Tradescantia. Spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif& Par). *Tecnología en Marcha*; 24(2): 3-17.
- Ramírez, G, Sandra. (2008a).** La moniliasis un desafío para lograr la sostenibilidad del sistema cacao en México. *Tecnología en Marcha*; 21(1):97-110.
- Ramírez, G, Sandra. (2008b).** Extractos vegetales para el manejo orgánico de la mancha negra (*Phytophthora palmivora*) del cacao (*Theobroma cacao*). Tesis Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas- México.

- Ramírez, S.** (2013). Efectividad de extractos vegetales en el manejo de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao L.*) en México. Tesis de Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.
- Ramírez, S. y López O.** (2006). El manejo orgánico integral de insectos plagas y enfermedades en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao L.*). In: López B. O., Ramírez G. S. I., Ramírez G. M., Moreno B. G., Alvarado G. A. (Ed). (2006). Agroecología y agricultura orgánica en el trópico. Primera edición, Editorial UPTC-UNACH, Tunja, Boyacá, Colombia; 240-264.
- Ramírez, S.; López O.; Guzmán, T.; Munguía, S. y Moreno, J.** (2011b). El polisulfuro de calcio en el manejo de la moniliasis, *Moniliophthora roreri*(Cif& Par). Evans et al. Del cacao *Theobroma cacao L.* *Tecnología en Marcha*.24 (4). 10-18.
- Sacchetti, G.; Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M. & Bruni, R.** (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*; 91(1): 621–632.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México (SAGARPA).** (2015). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Producción Agrícola 2013. Recuperado el 1 de junio de 2015 en <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.
- Sánchez, F. y Garcés F.** (2012). *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et ál., en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria.*; 3(3): 249 – 258.
- Sánchez, F.; Gamboa, E. & Rincón, J.** (2003). Control químico y cultural de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) del cacao (*Theobroma cacao L.*) en el Estado Barinas. *Rev. Fac. Agron*; 20(1): 188-194.
- Sahin, M. ; Güllüce, D; Sökmen, M.; Polissiou, G y Ozer, H.** (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*; 15(1): 549-557.
- Suárez, C.** (1979). Las enfermedades del cacao en Latinoamérica. In: 7° Conferencia Internacional de Investigación en Cacao. Douala, Cameroun. Proceedings; 251-254.
- Vergara, R.** (1997). De la agricultura tradicional a la agricultura biológica. Memorias Seminario Regional. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.