

EFFECTO ANTIFÚNGICO *in vitro* DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Capsicum* spp. EN *Moniliophthora roreri*

In vitro ANTIFUNGAL EFFECT OF METHANOLIC EXTRACTS OF *Capsicum* spp. ON *Moniliophthora roreri*

Dario De la Cruz-Ricardez¹, Carlos F. Ortiz-García^{1*}, Luz del C. Lagunes-Espinoza¹, Magdiel Torres-de la Cruz²

¹ Producción Agroalimentaria en el Trópico. Campus Tabasco. Colegio de Postgraduados. 86500. Cárdenas, Tabasco, México. (cfortiz@colpos.mx). ²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa-Cárdenas, Km 0.5, 86039, Villahermosa, Tabasco, México.

RESUMEN

Uno de los principales problemas fitosanitarios en la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Latinoamérica y en México es la moniliasis, causada por *Moniliophthora roreri*. Este fitopatógeno causa más del 75% de pérdidas en la producción anual. Los metabolitos secundarios del género *Capsicum* tienen efectos antifúngicos, por lo que se pueden usar para el control de *M. roreri*. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto *in vitro* de extractos metanólicos (EM) de tres especies de *Capsicum* sobre *M. roreri*. Los EM extraídos de frutos inmaduros de *C. chinense*, *C. frutescens*, y dos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* se probaron a dos concentraciones: 1000 y 2500 mg L⁻¹, y se evaluaron en la inhibición del crecimiento micelial, la esporulación y la viabilidad de conidios producidos de *M. roreri*. Ambas dosis (tratamientos) se establecieron bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones; cada caja de Petri fue una unidad experimental, los datos se analizaron con ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). *Moniliophthora roreri* fue sensible a los EM de las tres especies. Los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* en sus morfotipos amashito (AM) y garbanzo (GA) a 2500 mg L⁻¹ inhibieron el crecimiento micelial hasta en 95%. Los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* AM y GA a 2500 mg L⁻¹ inhibieron totalmente la producción de conidios en ambas concentraciones. Los EM de *C. chinense* y *C. annuum* var. *glabriusculum* GA inhibieron hasta 35% la viabilidad de conidios de *M. roreri*. La sensibilidad *in vitro* de *M. roreri* a EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* AM y GA permite sugerir el efecto de los extractos en el campo de cultivo.

ABSTRACT

One of the main plant protection problems in the production of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Latin America and Mexico is the frosty pod rot, caused by *Moniliophthora roreri*. This phytopathogen causes annual production damage of over 75%. The secondary metabolites of the *Capsicum* genus have antifungal effects, and can therefore be used to control *M. roreri*. The aim of this experiment was to evaluate the *in vitro* effect of methanolic extracts (ME) of three *Capsicum* species on *M. roreri*. The ME extracted from immature *C. chinense*, *C. frutescens* fruits and two morphotypes of *C. annuum* var. *glabriusculum* were tested at two concentrations — 1000 and 2500 mg L⁻¹ and evaluated for the inhibition of mycelial growth, sporulation and the viability of conidia produced by *M. roreri*. Both doses (treatments) were established under a complete randomized experimental design with five replicates; each Petri dish was one experimental unit. Data were analyzed with an ANOVA and the means were compared using Tukey's test ($p \leq 0.05$). *Moniliophthora roreri* was sensitive to the ME of the three species. The ME of *C. annuum* var. *glabriusculum*, in their amashito (AM) and garbanzo (GA) morphotypes at 2500 mg L⁻¹ inhibited mycelial growth by up to 95%. The EM of *C. annuum* var. *glabriusculum* AM and GA at 2500 mg L⁻¹ completely inhibited the production of conidia in both concentrations. The EM of *C. chinense* and *C. annuum* var. *glabriusculum* GA inhibited the viability of *M. roreri* conidia by up to 35%. The *in vitro* sensitivity of *M. roreri* to the EM of *C. annuum* var. *glabriusculum* AM and GA helps suggest the effect of the extracts on the field.

Key words: secondary metabolites, cacao frosty pod rot, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora roreri*, methanolic extracts, *C. annuum* var. *glabriusculum*.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2019. Aprobado: enero, 2020.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 813-824. 2020.

Palabras clave: metabolitos secundarios, moniliasis del cacao, *Theobroma cacao*, *Moniliophthora roreri*, extractos metanólicos, *C. annuum* var. *glabriusculum*.

INTRODUCCIÓN

La moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.) es una enfermedad fúngica ocasionada por *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) (Evans *et al.*, 1981) la cual ha provocado pérdidas significativas en las áreas productoras de cacao en Latinoamérica. El primer reporte de esta enfermedad fue en el noreste de Colombia, y después se diseminó progresivamente a 14 países de Centro y Sudamérica. En México, la moniliasis se reportó en el 2005 (Phillips-Mora *et al.*, 2006). Ahora se considera la mayor amenaza a la producción de cacao en México, ya que las pérdidas superan el 75% y pone en riesgo la sustentabilidad de este cultivo (Torres-De la Cruz *et al.*, 2011).

Moniliophthora roreri es un patógeno hemibiotrófico que afecta a los frutos de cacao en cualquier etapa de desarrollo. En su fase biotrófica, el patógeno crece intercelularmente y puede alterar el desarrollo de las semillas e inducir deformaciones del fruto (tumefacción). En su fase necrotrofica induce necrosis del endo y mesocarpio; después provoca necrosis en el pericarpio con la manifestación de manchas aceitosas y manchas “chocolate” en la superficie externa del fruto. La necrosis puede cubrir todo el fruto, seguida por la formación de un pseudoestroma blanco y la esporulación (Evans *et al.*, 1981). Los frutos necrosados y esporulados permanecen adheridos al árbol y proveen inóculo secundario o bien inóculo primario para el siguiente ciclo de cultivo (Torres-De la Cruz *et al.*, 2011).

Entre los métodos de control para disminuir esta enfermedad, el manejo cultural es el más utilizado, con acciones que incluyen la remoción semanal de frutos enfermos, mantenimiento del drenaje, control de arvenses, poda y reducción de la altura de los árboles de cacao, saneamiento de frutos eliminados y residuos de cosecha (Ortiz-García *et al.*, 2015). Otro método de control es el químico pero el uso de fungicidas con efectividad contra la moniliasis (Bateman *et al.*, 2005; Torres-De la Cruz *et al.*, 2013), se usa poco debido a los costos. Para el método con control genético Phillips-Mora *et al.* (2012) reportan a los clones CATIE-R4 y CATIE-R6 como resistentes a moniliasis, pero el comportamiento agronómico está en validación en varios países latinoamericanos.

INTRODUCTION

The frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao* L.) is a fungal disease caused by *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) (Evans *et al.*, 1981), which has led to significant losses in the cacao-producing areas of Latin America. The first report of this disease was in northeastern Colombia, and it slowly spread to 14 countries in Central and South America. In Mexico, frosty pod rot was reported in 2005 (Phillips-Mora *et al.*, 2006). It is now considered the largest threat to cacao production in Mexico, since losses surpassed 75% and jeopardize the sustainability of this crop (Torres-De la Cruz *et al.*, 2011).

Moniliophthora roreri is a hemibiotrophic pathogen that affects cacao fruits in any stage of growth. In its biotrophic phase, the pathogen grows intracellularly and can alter the development of seeds and lead to deformities in the fruit (swelling). In its necrotrophic phase, it induces necrosis of the endocarp and mesocarp, then necrosis in the pericarp with oily spots and “cocoa” spots on the outer surface of the fruit. The necrosis may cover the entire fruit, followed by the formation of a white pseudoestroma and sporulation (Evans *et al.*, 1981). Necrotic and sporulated fruits remain stuck to the trees and provide secondary inoculant or primary inoculant for the next cycle (Torres-De la Cruz *et al.*, 2011).

Among the control methods for this disease, cultural management is the most commonly used, with actions that include the weekly removal of diseased fruits, drainage maintenance, weed control, trimming and reduction of the height of cacao trees, and sanitation of eliminated fruits and harvest residues (Ortiz-García *et al.*, 2015). Another control method is chemical, although the use of effective fungicides against frosty pod rot (Bateman *et al.*, 2005; Torres-De la Cruz *et al.*, 2013) is scarcely used due to high costs. For the method by genetic control, Phillips-Mora *et al.* (2012) report the clones CATIE-R4 and CATIE-R6 as resistant to frosty pod rot (moniliasis), but the agronomic behavior is under validation in several Latin American countries.

In the search for sustainable methods to control frosty pod rot, fungi with antagonistic potential for biological control have been evaluated (Villamil *et al.*, 2015; Reyes-Figueroa *et al.*, 2016). Also, the use of plant extracts has been proposed for the control of *M. roreri* (Ramírez *et al.*, 2011; De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2016). Additionally, fruits of the *Capsicum*

En la búsqueda de métodos sustentables para el control de la moniliasis, se han evaluado hongos con potencial antagonista para el control biológico (Villamil *et al.*, 2015; Reyes-Figueroa *et al.*, 2016). Además, se ha propuesto el uso de extractos vegetales para el control de *M. roreri* (Ramírez *et al.*, 2011; De la Cruz-Ricardez *et al.*, 2016). También se ha demostrado que frutos del género *Capsicum* poseen algunos metabolitos secundarios con potencial antifúngico (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015; Bacon *et al.*, 2017; Martinelli *et al.*, 2017). Sin embargo, la efectividad de EM de frutos del género *Capsicum*, sobre *M. roreri*, no se ha evaluado. Así la hipótesis de este estudio es que al menos un EM muestre efectos deletéreos sobre el patógeno. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro*, el efecto del EM de frutos de tres especies de *Capsicum* sobre *M. roreri*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de *Moniliophthora roreri*

El aislamiento de *M. roreri* (CPMR1701) fue proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco, previamente aislado de frutos de cacao en estado inicial de necrosis externa, de un huerto familiar con manejo cultural del estado de Tabasco, e identificado por morfología y secuencia ITS (número de acceso GenBank: GU108605). La cepa se preservó en completa oscuridad, como cultivo monospórico en medio de cultivo V8 sólido.

Colecta de material vegetal

Las muestras fueron de frutos inmaduros (color verde) de tres especies de *Capsicum*: *C. chinense* Jacq, *C. frutescens* L. y *C. annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill morfotipos amashito (AM) y garbanzo (GA). Los morfotipos AM y GA se corroboraron con ejemplares depositados en el herbario CSAT por Prado-Urbina *et al.* (2015) y clasificados como *C. annuum* var. *glabriusculum* por Velázquez-Ventura *et al.* (2018). Los frutos de los dos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* y de *C. frutescens* se recolectaron por la mañana, el 07 de mayo de 2017 en poblaciones silvestres del Ejido Rafael Martínez de Escobar, Huimanguillo, Tabasco, México (17° 43' 18.2" N, 93° 23' 10.7" O); los frutos de *C. chinense* se obtuvieron de un cultivo comercial. Cien frutos de los dos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* y de *C. frutescens* y 25 de *C. chinense*, se secaron al sol por 36 h. Después, se trituraron en un molino para granos de café (KRUPS®, GX410011, Alemania) hasta obtener un polvo fino, el

genus have also been proven to contain secondary metabolites with antifungal properties (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015; Bacon *et al.*, 2017; Martinelli *et al.*, 2017). However, the effectiveness of ME of *Capsicum* fruits on *M. roreri* has not been evaluated. Thus, the hypothesis of this study is that at least one ME shows deleterious effects on the pathogen. Therefore, the aim of this research was to evaluate *in vitro* the effect of the ME from three *Capsicum* species on *M. roreri*.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of *Moniliophthora roreri*

The isolation for *M. roreri* (CPMR1701) was provided by the Plant Pathology Laboratory of the Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco and was previously isolated from cacao fruits in an initial state of external necrosis taken from a domestic orchard with cultural management in the state of Tabasco and identified by morphology and ITS sequence (GenBank access number: GU108605). The strain was preserved in complete darkness as a monosporic culture in a solid V8 culture medium.

Plant material collection

The samples were from immature fruits (green color) of three species of *Capsicum*: *C. chinense* Jacq, *C. frutescens* L. and *C. annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill, of the amashito (AM) and garbanzo (GA) morphotypes. AM and GA morphotypes were corroborated with samples deposited in the CSAT herbarium by Prado-Urbina *et al.* (2015) and classified as *C. annuum* var. *glabriusculum* by Velázquez-Ventura *et al.* (2018). The fruits of both *C. annuum* var. *glabriusculum* and *C. frutescens* morphotypes were collected in the morning of May 7, 2017 from wild populations of the Ejido Rafael Martínez de Escobar, Huimanguillo, Tabasco, Mexico (17° 43' 18.2" N, 93° 23' 10.7" O); the *C. chinense* fruits were taken from a commercial plantation.

One hundred fruits of both *C. annuum* var. *glabriusculum* and *C. frutescens* morphotypes and 25 *C. chinense* fruits were sun-dried for 36 h. They were then ground in a coffee seeds mill (KRUPS®, GX410011, Germany) until a fine powder was obtained, which was packed into plastic containers with lids and refrigerated at 5 °C until use.

Determination of methanolic extracts

Two grams of each species were added 20 mL of 80% methanol, placed in a double boiler at 50 °C for 30 min

cual se empacó en recipientes de plástico con tapa y almacenado en refrigeración a 5 °C hasta su uso.

Determinación de los extractos metanólicos

A 2 g de cada especie se agregaron 20 mL de metanol al 80%, se colocaron en baño María a 50 °C por 30 min y se centrifugaron a 10173 x g durante 15 min en una centrífuga marca Hermle Z 383 modelo 2383 (Alemania). El sobrenadante (EM) se recuperó y se guardó en oscuridad a 5 °C hasta su uso.

Los EM se cuantificaron mediante la concentración de polifenoles totales (PFT) de acuerdo con Singleton *et al.* (1999); se tomaron 0.2 mL del extracto obtenido y se adicionaron 1.5 mL de agua destilada, 0.1 mL del reactivo Folin-Denis al 50% y 0.2 mL de carbonato de sodio anhidro al 15%. Los contenidos se mezclaron en vórtex y se incubaron 30 min en la oscuridad. Para la curva de calibración se preparó una solución stock de 100 µg mL⁻¹ de ácido gálico (Sigma-Aldrich®). A partir de la solución stock, se realizaron soluciones estándar de 0 a 100 µg mL⁻¹. Las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 765 nm en un espectrómetro UV-VIS (Multiskan Go 51119300; Thermo Fisher Scientific, Finlandia). La cuantificación de PFT se realizó por triplicado en diferentes concentraciones (Cuadro 1).

Bioensayo de actividad antifúngica *in vitro*

El potencial antifúngico de los EM se determinó por la evaluación del crecimiento micelial (CM), la esporulación (ES) y la viabilidad de los conidios (VC) producidos de *M. roseri* CPMR1701. Los EM se prepararon a concentraciones de 1000 y 2500 mg L⁻¹ de PFT. Para ello, se calculó el volumen de EM necesario para obtener cada concentración y se depositó en matraces Erlenmeyer de 25 mL que se colocaron a 70 °C hasta la completa evaporación del solvente (4 h). El residuo se homogenizó con 5 mL de agua destilada estéril. Este extracto libre de metanol (ESM) se agregó al medio de cultivo V8 clarificado antes de vaciar a las cajas de Petri, utilizando jeringas con filtros de 0.20 µm (Corning®, Alemania) para mantener la asepsia del

and centrifuged at 10173 x g for 15 min in a Hermle Z 383 model 2383 centrifuge (Germany). The supernatant (ME) was recovered and stored in the dark at 5 °C until use.

The MEs were quantified with the concentration of total polyphenols (TPP), following Singleton *et al.* (1999); 0.2 mL were taken from the resulting extract and 1.5 mL of distilled water were added, along with 0.1 mL of the Folin-Denis reagent at 50% and 0.2 mL of anhydrous sodium carbonate 15%. The contents were mixed in a vortex and incubated for 30 min in the dark. For the calibration curve, a stock solution of 100 µg mL⁻¹ of gallic acid (Sigma-Aldrich®) was prepared. From the stock solution, standard solutions of 0 to 100 µg mL⁻¹ were prepared. The absorbance readings were carried out at a wavelength of 765 nm in a UV-VIS (Multiskan Go 51119300; Thermo Fisher Scientific, Finland) spectrometer. The quantification of TPP was carried out in triplicate in different concentrations (Table 1).

Bioassay of antifungal activity *in vitro*

The antifungal potential of the MEs was determined by the evaluation of the mycelial growth (MG), the sporulation (ES) and the viability of the conidia (VC) produced by *M. roseri* CPMR1701. The MEs were prepared at concentrations of 1000 and 2500 mg L⁻¹ of TPP. In order to do this, the volume of MEs required to obtain each concentration was calculated and deposited in 25 mL Erlenmeyer flasks which were placed under 70 °C temperatures until the solvent evaporated completely (4 h). The residue was homogenized with 5 mL of sterile distilled water. This methanol-free extract (MFE) was added to the clarified V8 culture medium before pouring into the Petri dishes, using syringes with 0.20 µm filters (Corning®, Germany) to maintain the asepsis of the medium. For the control (without ME), 5 mL of sterile distilled water were added to the clarified V8 culture medium before pouring into the Petri dishes, using the same filters. Then, 5 mL of culture medium with MFE were transferred to 60 mm Petri dishes with a self-filling syringe (Socorex® 173, Switzerland). *Moniliophthora roseri* CPMR1701 was inoculated with a mycelium disc, approximately 5 mm in diameter, in the

Cuadro 1. Concentración de polifenoles totales (PFT) en frutos inmaduros de tres especies de *Capsicum*.
Table 1. Concentration of total polyphenols (TPP) in immature fruits of three *Capsicum* species.

Especie	PFT (mg g ⁻¹) [†]
<i>C. chinense</i>	13.50
<i>C. frutescens</i>	12.32
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> morfotipo AM	9.62
<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> morfotipo GA	6.65

[†] PFT: polifenoles totales en peso seco. ❖ TPP: total polyphenols in dry weight.

medio. Para el testigo (sin EM) se agregaron 5 mL de agua destilada estéril al medio de cultivo V8 clarificado antes de vaciar a las cajas de Petri, utilizando los mismos filtros. Después, 5 mL de medio de cultivo con ESM se transfirieron a cajas de Petri de 60 mm mediante una jeringa de autollenado (Socorex® 173, Suiza). *Moniliophthora roreri* CPMR1701 se inoculó con disco de micelio de aproximadamente 5 mm de diámetro en el centro de cada caja de Petri con medio V8 clarificado + ESM, el cual se incubó a 25 °C en oscuridad completa.

VARIABLES EVALUADAS

Crecimiento micelial de *M. roreri* CPMR1701

El diámetro del crecimiento micelial (CM) se midió con un vernier manual (Pretul® modelo VER-6P, México) en dos ejes ortogonales. Las mediciones se realizaron cada 24 h y concluyó cuando las colonias del tratamiento testigo llenaron completamente la caja de Petri. El porcentaje de inhibición del CM por tratamiento en relación al testigo se calculó con la siguiente fórmula:

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100 \quad (1)$$

donde E: Eficiencia, V_t: valor de la variable en el testigo, E_m: valor de la variable en el tratamiento con los EM.

Esporulación de *M. roreri* CPMR1701

En las cajas de Petri donde se observó el CM, se agregaron 5 mL de agua destilada estéril + Tween 80 (0.1%), para la colección de conidios con espátula de acero inoxidable esteril. El sobrenadante se homogenizó 10 min con agitador magnético (Thermolyne®, Artur H. Thomas Co., EE.UU.), después se filtró con gasas estériles para separar el micelio. La solución se depositó en un tubo con tapa, previamente esterilizado. El conteo de conidios se realizó en cámara de Neubauer (Hausser Scientific, EE.UU.). La concentración de conidios·mL⁻¹ se estimó mediante la fórmula (Lipa y Slizynski, 1973):

$$C = (C_c) (4 \times 10^6) (F_d 80^{-1}) \quad (2)$$

donde C: número de conidios mL⁻¹, C_c: número promedio de conidios contados en la cámara de Neubauer y F_d: factor de dilución

Viabilidad de conidios de *M. roreri* CPMR1701

Para la VC se obtuvo una suspensión de 5x10⁶ conidios mL⁻¹, de la cual se depositaron 30 μL en cuatro zonas de la caja de Petri

center of each Petri dish with clarified V8 medium + MFE, which was incubated at 25 °C in complete darkness.

Measured variables

Mycelial growth of *M. roreri* CPMR1701

The diameter of the mycelial growth (MG) was measured using a manual caliper (Pretul® model VER-6P, Mexico) in two orthogonal axes. Measurements were taken every 24 h and we concluded when the control treatment cultures filled the Petri dish completely. The percentage of inhibition of the MG per treatment in relation to the control was calculated using the following formula:

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100 \quad (1)$$

where E: Efficiency, V_t: value of the variable in the control, E_m: value of the variable in the treatment with the MEs.

Sporulation of *M. roreri* CPMR1701

In the Petri dishes in which the MG was observed, 5 mL were added of sterile distilled water + Tween 80 (0.1%) to collect conidia with a sterilized stainless-steel spatula. The supernatant was homogenized for 10 min with a magnetic stirrer (Thermolyne®, Artur H. Thomas Co., EE.UU.) and was then filtered with sterile gauzes to separate the mycelium. The solution was placed in a previously sterilized tube with a lid. The conidia count was carried out in a Neubauer chamber (Hausser Scientific, U.S.A.). The concentration of conidia mL⁻¹ was estimated using the following formula (Lipa and Slizynski, 1973):

$$C = (C_c) (4 \times 10^6) (F_d 80^{-1}) \quad (2)$$

where C: number of conidia mL⁻¹, C_c: average number of conidia counted in the Neubauer chamber, and F_d: dilution factor.

Viability of *M. roreri* CPMR1701 conidia

For the VC, we obtained a suspension of 5x10⁶ conidia mL⁻¹, out of which 30 μL were deposited in four areas of the Petri dish with clarified V8 medium. The aliquot of conidia was covered with sterile slide cover and the dishes with V8 + inoculant were incubated at 25±0.5 °C in the dark. Observations and registers were performed every 24 h until the control strains displayed a germination of 90% (120 h). The conidia were considered germinated when the germinative tube reached the length of half a conidium (4-6 μm). The percentage of germination was obtained by observing 100 conidia per treatment and replicate.

con medio V8 clarificado. La alícuota de conidios se cubrió con cubreobjetos estériles y las cajas con medio V8 + inóculo se incubaron a 25 ± 0.5 °C en oscuridad. Las observaciones y el registro se efectuaron cada 24 h hasta que en las cepas testigo se cuantificó el 90% de germinación (120 h). Los conidios se consideraron germinados cuando el tubo germinativo alcanzó la longitud de la mitad del conidio ($4-6\ \mu\text{m}$). El porcentaje de germinación se obtuvo de la observación de 100 conidios por tratamiento y repetición.

La efectividad de los EM sobre el CM, Esporulación (ES) y VC se calculó con la fórmula de Abbott (1925):

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100 \quad (3)$$

donde E: Eficiencia, V_t : valor de la variable en el testigo, E_m : valor de la variable en el tratamiento con los EM.

Diseño experimental

Los resultados de cada bioensayo se analizaron estadísticamente con un diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial; considerando como tratamientos (ocho) a las combinaciones de los factores: materiales vegetales (*C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annuum* var. *glabriusculum*-morfortipos AM y *C. annuum* var. *glabriusculum*-morfortipos GA) y concentraciones (1000 y $2500\ \text{mg L}^{-1}$). Además, de la inclusión de un testigo positivo ($0.0\ \text{mg L}^{-1}$ EM) con cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una caja de Petri. Los datos en porcentajes de CM, ES y VC se transformaron con la función al coseno de la raíz cuadrada del valor porcentual. El análisis de varianza (ANDEVA) se realizó con el software InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) a un nivel de error con $p \leq 0.05$. Los promedios de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento micelial de *M. roreri* CPMR1701

El crecimiento de las colonias correspondiente a tratamientos, respecto al testigo, se desarrolló con forma, tamaño y textura normal, de color crema, con centro de color café claro a salmón; las colonias mostraron la esporulación tal como la describen Evans *et al.* (1981) en cultivo *in vitro*. Asimismo, se observaron crecimientos diferenciados por efecto de los tratamientos. Con los EM de los dos morfortipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* en concentración de $2500\ \text{mg L}^{-1}$, la colonia de *M. roreri* solo creció

The effectiveness of the MEs on the MG, sporulation (ES) and VC were reached using Abbott's formula (1925):

$$E = ((V_t - E_m) / V_t) * 100 \quad (3)$$

where E: Efficiency, V_t : value of the variable in the control, E_m : value of the variable in the treatment with the ME.

Experimental design

The results of each bioassay were analyzed statistically with a completely randomized experimental design (DCA) with a factorial arrangement; considering as treatments (eight), the combinations of the following factors: plant materials (*C. chinense*, *C. frutescens*, *C. annuum* var. *glabriusculum*-morfortipos AM and *C. annuum* var. *glabriusculum*-morfortipos GA) and concentrations (1000 and $2500\ \text{mg L}^{-1}$), as well as the inclusion of a positive control ($0.0\ \text{mg L}^{-1}$ ME) with five replicates per treatment. The experimental unit was one Petri dish. The data, in percentages, of MG, ES and VC were transformed with the function to the arcsine of the square root of the percentage value. The analysis of variance (ANOVA) was performed using the software InfoStat version 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) at a probability error of $p \leq 0.05$. Treatment means were compared using the Tukey's test.

RESULTS AND DISCUSSION

Mycelial growth of *M. roreri* CPMR1701

The growth of cultures corresponding to treatments, regarding the control, occurred in normal shape, size and texture; cream colored, with a light brown to salmon-colored center; the cultures displayed sporulation just as described by Evans *et al.* (1981) for *in vitro* culture. Likewise, different growths were observed due to the effect of the treatments. With the MEs of both *C. annuum* var. *glabriusculum* morphotypes in a concentration of $2500\ \text{mg L}^{-1}$, the *M. roreri* culture only grew around the inoculated mycelium disc, with dense mycelia and a lighter appearance. In addition, at both concentrations of the *C. chinense* and *C. frutescens* ME, cultures presented different mycelium textures in comparison with the control (Figure 1).

Regarding the efficiency results (%) of the *Capsicum* spp. MEs on the MG of the studied strain, ANOVA showed that the *Capsicum* MEs have an antifungal potential *in vitro* against *M.*

alrededor del disco del micelio inoculado, con micelio denso y una apariencia más clara. Además, en ambas concentraciones del EM de *C. chinense* y *C. frutescens*, se muestran en las colonias texturas de micelio diferentes con respecto al testigo (Figura 1).

roveri CPMR1701 (Figure 2). The effectiveness over MG showed significant difference ($p \leq 0.05$). The treatments with greater effectiveness over the MG were the *C. annuum* var. *glabriusculum* MEs morphotype AM-2500 mg L⁻¹ (97.69%) and *C.*

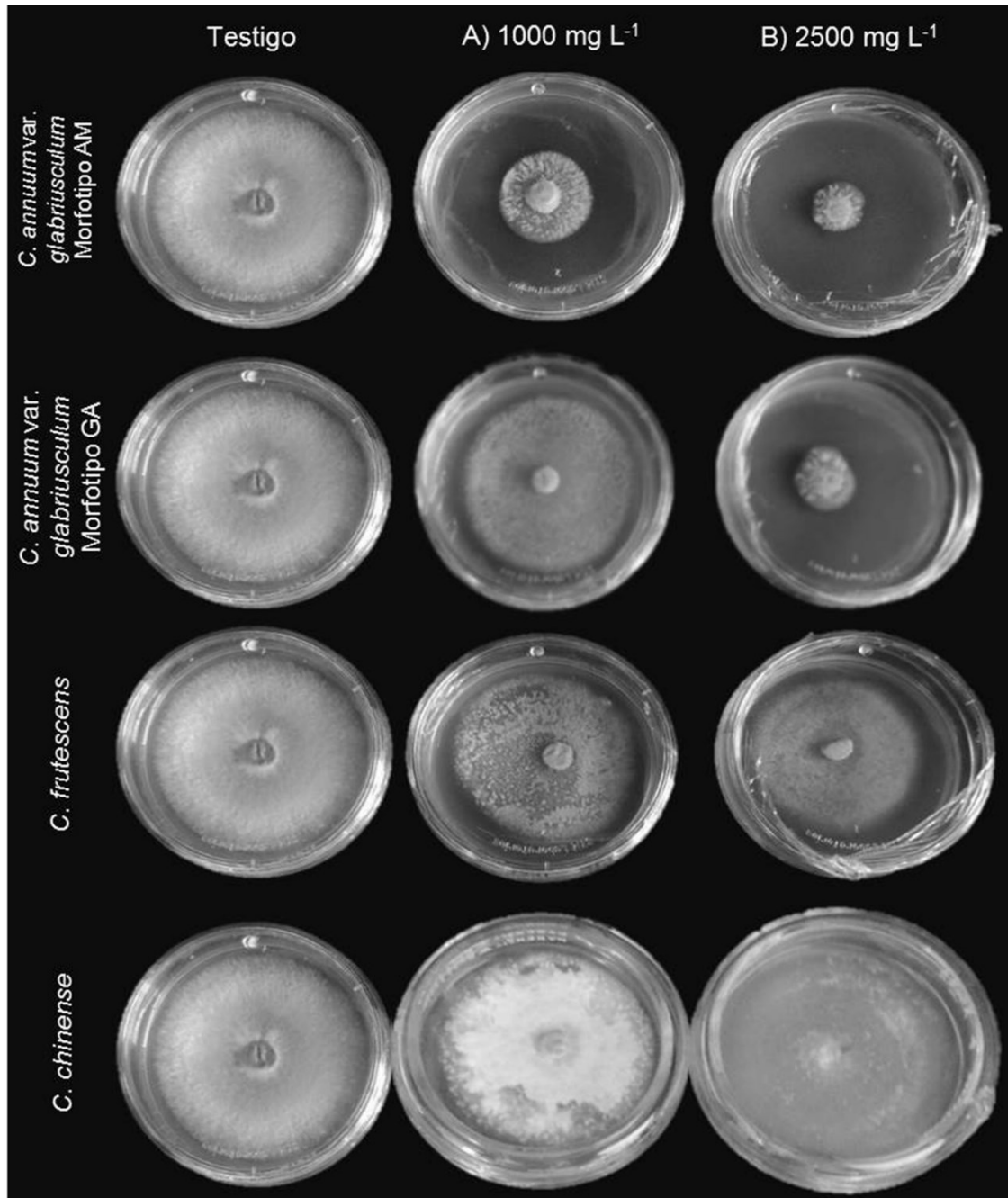


Figura 1. Efecto de dos concentraciones (A-B) de extractos metanólicos de tres especies de *Capsicum* sobre el crecimiento micelial de *Moniliophthora roveri*.

Figure 1. Effect of two concentrations (A-B) of methanolic extracts from three *Capsicum* species on the mycelial growth of *Moniliophthora roveri*.

Respecto a los resultados de eficiencia (%) de los EM de *Capsicum* spp. en el CM de la cepa estudiada, el ANDEVA mostró que los EM de *Capsicum*, tienen potencial antifúngico *in vitro* contra *M. royeri* CPMR1701 (Figura 2). La efectividad sobre el CM mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Los tratamientos con la mayor efectividad sobre el CM fueron los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo AM-2500 mg L⁻¹ (97.69%) y *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo GA-2500 mg L⁻¹ (96.21%). Mientras *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo AM a 1000 mg L⁻¹ mantuvo una eficiencia mayor al 85%. Sin embargo, los EM de *C. chinense* a 2500 mg L⁻¹ (22.11%) y 1000 mg L⁻¹ (21.84%) presentaron eficiencia menor sobre el CM.

En nuestro estudio el efecto de *C. annuum* var. *glabriusculum* sobre el CM de *M. royeri* fue mayor a lo registrado por Rodríguez-Maturino *et al.* (2015), quienes observaron eficiencia de inhibición de 38.46% sobre el CM de *Alternaria alternata*, pero la concentración del extracto utilizado fue 100 mg mL⁻¹. Bacon *et al.* (2017) encontraron porcentajes de inhibición superiores respecto al testigo con extractos de *C. annuum* var. *annuum* sobre el crecimiento de las

annuum var. *glabriusculum*, morfotipo GA-2500 mg L⁻¹ (96.21%). Whereas *C. annuum* var. *glabriusculum*, morfotipo AM at 1000 mg L⁻¹ maintained an efficiency of above 85%. However, the *C. chinense* MEs at 2500 mg L⁻¹ (22.11%) and 1000 mg L⁻¹ (21.84%) presented a lower efficiency on the MG.

In our study, the effect of *C. annuum* var. *glabriusculum* on the MG of *M. royeri* was higher than registered by Rodríguez-Maturino *et al.* (2015), who observed an inhibition efficiency of 38.46% on the MG of *Alternaria alternata*, but the concentration of the extract used was 100 mg mL⁻¹. Bacon *et al.* (2017) found higher percentages of inhibition than the control with *C. annuum* var. *annuum* extracts on the growth of pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. The lower effect of the ME of *C. chinense* was observed on *Aspergillus niger* and *Candida albicans* (Martinelli *et al.*, 2017). Also, the ME of *C. frutescens* seeds showed no effectiveness on *A. flavus*, but they did show effectiveness on *C. albicans*, *C. krusei*, *A. niger* and *A. alternata*, indicating that the effect varies with the *Capsicum* species used and the species of the pathogen under study

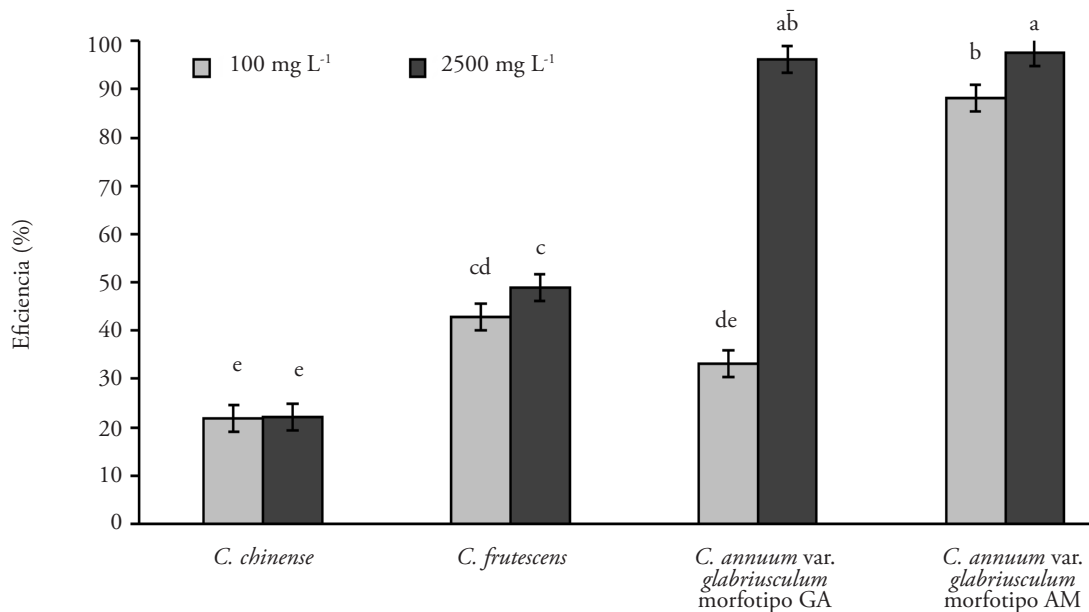


Figura 2. Efectividad *in vitro* de extractos metanólicos de tres especies de *Capsicum* sobre el crecimiento micelial de *M. royeri* CPMR1701 a 1000 y 2500 mg L⁻¹. Barras con letra diferente presentan diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 2. Effectiveness of *in vitro* extraction of methanolic acids from three *Capsicum* species on the mycelial growth of *M. royeri* CPMR1701 at 1000 and 2500 mg L⁻¹. Bars with different letters show statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

bacterias patógenas *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica*. El efecto menor del EM de *C. chinense* se observó sobre *Aspergillus niger* y *Candida albicans* (Martinelli *et al.*, 2017). Además, EM de semillas de *C. frutescens* no mostraron efectividad sobre *A. flavus*, pero mostraron efectividad sobre *C. albicans*, *C. krusei*, *A. niger* y *A. alternata*, lo cual indica que el efecto varía de acuerdo con la especie de *Capsicum* empleada y la especie del patógeno en estudio (Gurnani *et al.*, 2016). Tamayo-España *et al.* (2016) indicaron que extractos de material fresco y seco de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* en concentraciones de 50 y 40% (V/V) inhibían por completo el CM de *M. roreri*. Los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* se suman a las especies con potencial para el control de *M. roreri*.

Esporulación de *M. roreri* CPMR1701

Diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) existieron en la efectividad de los EM de las especies diferentes de *Capsicum* sobre la ES de *M. roreri* CPMR1701 (Figura 3). Los EM con efectividad inhibitoria al 100% sobre la ES de *M. roreri* CPMR1701 fueron las dos concentraciones de *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo AM y la concentración de 2500 mg L⁻¹ del morfotipo GA.

(Gurnani *et al.*, 2016). Tamayo-España *et al.* (2016) indicated that extracts of fresh and dry *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* and *Zingiber officinale* material in concentrations of 50 and 40% (V/V) completely inhibited the MG of *M. roreri*. The MEs of *C. annuum* var. *glabriusculum* were added to the species with a potential for the control of *M. roreri*.

Sporulation of *M. roreri* CPMR1701

Statistical difference ($p \leq 0.05$) existed in the effectiveness of the MEs of the different *Capsicum* species on the ES of *M. roreri* CPMR1701 (Figure 3). The MEs with an inhibiting effect of 100% on the ES of *M. roreri* CPMR1701 were the two concentrations of *C. annuum* var. *glabriusculum*, morphotype AM and the concentration of 2500 mg L⁻¹ of the morphotype GA.

The least effective treatment was *C. chinense*-1000 mg L⁻¹, with 7.59%. The reviewed literature shows no evidence of the effect of *Capsicum* spp. ME on the production of conidia of phytopathogenic fungi. Nevertheless, there are studies on the effect of extracts of other plant species on the ES of *M. roreri*. In that regard, Tamayo-España *et al.* (2016) found that *O. vulgare*, *T. spathacea* and *Z. officinale* extracts in concentrations of 50 and 40% (V/V)

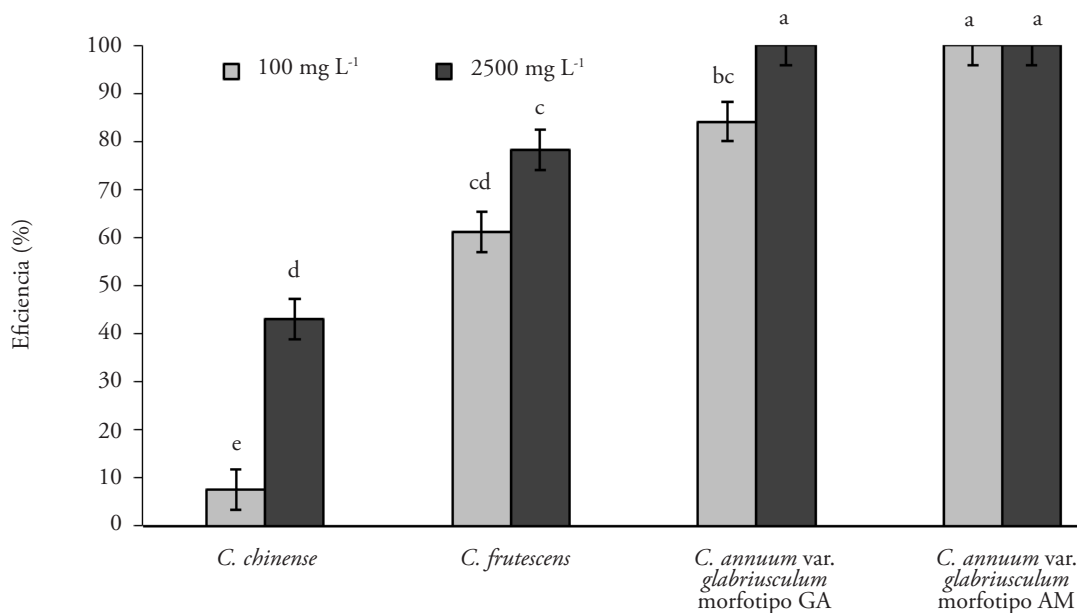


Figura 3. Efectividad *in vitro* de extractos metanólicos de tres especies de *Capsicum* sobre la esporulación de *M. roreri* a 1000 y 2500 mg L⁻¹. Barras con letra diferente presentan diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 3. *In vitro* effectiveness of methanolic extracts from three *Capsicum* species on the sporulation of *M. roreri* at 1000 and 2500 mg L⁻¹. Bars with different letters show statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

El tratamiento con efectividad menor fue *C. chinense*-1000 mg L⁻¹, con 7.59%. En la literatura revisada no hay evidencia sobre el efecto de EM de *Capsicum* spp. en la producción de conidios de hongos fitopatógenos. Pero existen estudios del efecto de extractos de otras especies vegetales sobre la ES de *M. royeri*. Al respecto, Tamayo-España *et al.* (2016) encontraron que extractos de *O. vulgare*, *T. spathacea* y *Z. officinale* en concentraciones de 50 y 40% (V/V) inhibieron por completo (100%) la formación de conidios de *M. royeri*. Además, De la Cruz-Ricardez *et al.* (2016) informaron que el extracto alcaloideo de semillas de *Lupinus montanus*, en concentración de 10 mg mL⁻¹, inhibe en 83.6% la esporulación de *M. royeri* CPMR1701.

Viabilidad de conidios de *M. royeri* CPMR1701

Las diferencias en la efectividad de los EM, de las especies de *Capsicum*, sobre la VC de *M. royeri* CPMR1701 fueron significativas ($p \leq 0.05$) (Figura 4). El tratamiento que indujo la mayor pérdida de viabilidad fue el EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo GA-1000 mg L⁻¹ (35.8%), sin diferencias significativas con *C. chinense* a 2500 mg L⁻¹ y 1000 mg L⁻¹.

completely inhibited (100%) the formation of *M. royeri* conidia. Additionally, De la Cruz-Ricardez *et al.* (2016) reported that the alkaloid extract of *Lupinus montanus* seeds, in concentrations of 10 mg mL⁻¹, inhibits by 83.6% the sporulation of *M. royeri* CPMR1701.

Viability of *M. royeri* CPMR1701 conidia

The difference in the effectiveness of MEs of the *Capsicum* species on the VC of *M. royeri* CPMR1701 were significant ($p \leq 0.05$) (Figure 4). The treatment that led to the greatest loss in viability was the *C. annuum* var. *glabriusculum* ME, morphotype GA-1000 mg L⁻¹ (35.8%); no significant difference with *C. chinense* at 2500 mg L⁻¹ and 1000 mg L⁻¹.

Treatments with the lowest effect on the VC were *C. frutescens*-1000 mg L⁻¹ and *C. frutescens*-2500 mg L⁻¹, with an effectiveness below 10%. The treatments with the two morphotypes of *C. annuum* var. *glabriusculum* were not included in VC evaluation because they completely inhibited (100%) the ES in the bioassay. We did not evaluate the direct effect of the MEs on germination, although its effect on VC was evident. The effect of *C. chinense* and *C. annuum* var. *glabriusculum* GA on the VC of *M. royeri* CPMR1701 is documented here for the first time.

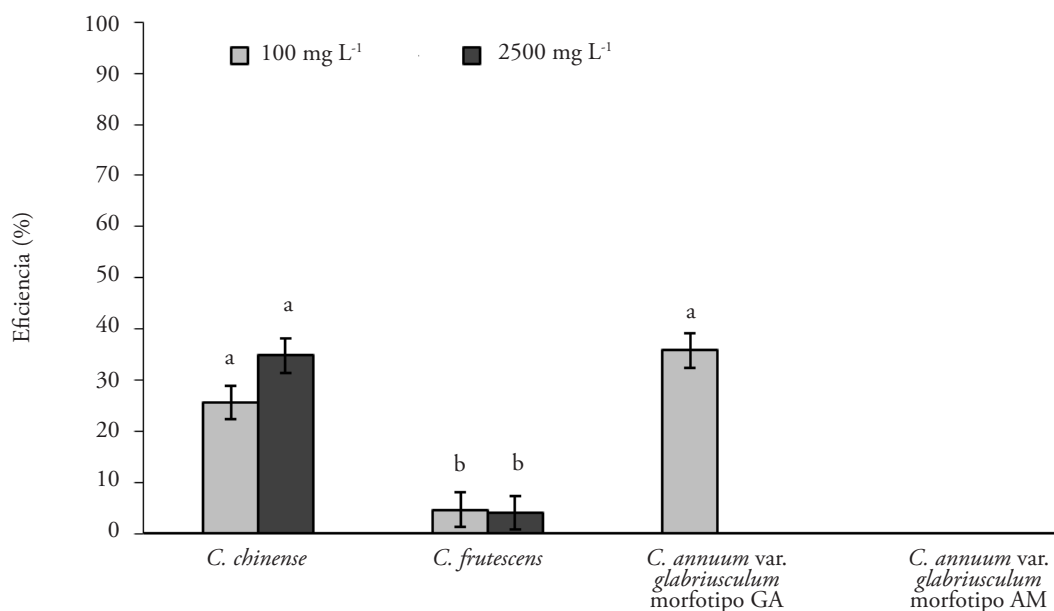


Figura 4. Efecto *in vitro* de extractos metanólicos de tres especies de *Capsicum* a 1000 y 2500 mg L⁻¹, sobre la viabilidad de conidios de *M. royeri*. Barras con letra diferente presentan diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 4. *In vitro* effect of methanolic extracts from three *Capsicum* species at 1000 and 2500 mg L⁻¹, on the viability of *M. royeri* conidia. Bars with different letters show statistical difference (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los tratamientos con efecto menor sobre la VC fueron *C. frutescens*-1000 mg L⁻¹ y *C. frutescens*-2500 mg L⁻¹, con efectividad menor al 10%. Los tratamientos con los dos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum*, no se incluyeron en esta evaluación porque en el bioensayo, estos inhibieron por completo (100%) la ES. En este estudio no se evaluó el efecto directo de los EM sobre la germinación, pero su efecto sobre la VC fue evidente. El efecto de *C. chinense* y *C. annuum* var. *glabriusculum* GA sobre la VC de *M. roreri* CPMR1701 se documenta aquí por primera vez.

Ngai y Ng (2007) encontraron efectividad de extractos de *C. frutescens* var. *fasciculatum* sobre la germinación de conidios de *F. moniliforme* y *A. flavus*, pero no mostraron efectividad sobre esta variable en *F. graminearum*, *F. solani*, *Physalospora piricola* y *Botrytis cinerea*. Además, extractos fenólicos de *C. annuum* var. *glabriusculum* redujeron la germinación de conidios de *A. alternata* al 92% y de *F. oxysporum* al 85% (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). En nuestra investigación, el efecto de los EM de *C. annuum* var. *glabriusculum* fue muy fuerte al inhibir completamente la producción de conidios, lo cual impidió medir su efecto sobre la VC.

La variación de la eficiencia de los EM de las especies de *Capsicum* sobre el CM, ES y VC de *M. roreri* CPMR1701 se puede deber a diferencias entre el perfil fitoquímico de los EM de cada especie. Al respecto, Bacon *et al.* (2017) indicaron que el efecto de los extractos de *Capsicum* sobre los microorganismos no es exclusivo de un componente en particular, sino del conjunto de componentes presentes en el extracto.

CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de *C. frutescens*, *C. chinense* y de ambos morfotipos de *C. annuum* var. *glabriusculum* mostraron efectividad diferente en el crecimiento micelial, la esporulación y la viabilidad de conidios de *M. roreri* CPMR1701, según las concentraciones de extractos metanólicos utilizadas.

El extracto de *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo Amashito alcanzó el mayor efecto, al nulificar el crecimiento micelial y la esporulación de *M. roreri* CPMR1701, incluso en su concentración más baja.

Los extractos de *C. chinense* y *C. annuum* var. *glabriusculum* morfotipo Garbanzo permitieron la esporulación de *M. roreri* CPMR1701, pero mostraron

Ngai and Ng (2007) found effectiveness in extracts of *C. frutescens* var. *fasciculatum* on the germination of *F. moniliforme* and *A. flavus* conidia, but they showed no effectiveness on this variable in *F. graminearum*, *F. solani*, *Physalospora piricola* and *Botrytis cinerea*. In addition, phenolic *C. annuum* var. *glabriusculum* extracts reduced the germination of *A. alternata* conidia by 92% and *F. oxysporum* by 85% (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2015). In our research, the effect of the *C. annuum* var. *glabriusculum* MEs was very strong, since they completely inhibited the production of conidia, which prevented us from measuring that ME effect on VC.

The variation of the efficiency of the MEs from *Capsicum* species on the MG, ES and VC of *M. roreri* CPMR1701 may be due to differences in the ME phytochemical profile of each species. Regarding that, Bacon *et al.* (2017) indicated that the effect of *Capsicum* extracts on the microorganisms is not exclusive to one particular component, but rather depends on the particular set of components present in the extract.

CONCLUSIONS

The methanolic extracts of *C. frutescens*, *C. chinense* and both morphotypes of *C. annuum* var. *glabriusculum* showed different effectiveness on the mycelial growth, sporulation and viability of *M. roreri* CPMR1701 conidia, depending on the concentrations of methanolic extracts used.

The extract of *C. annuum* var. *glabriusculum*, morphotype Amashito reached the greatest effect, since it nullified mycelial growth and sporulation of *M. roreri* CPMR1701, even in its lowest concentration.

The extracts of *C. chinense* and *C. annuum* var. *glabriusculum*, morphotype Garbanzo allowed the sporulation of *M. roreri* CPMR1701, but showed a negative impact on the viability of conidia. This is the first report on the antifungal effect of methanolic extracts of *Capsicum* spp. on *M. roreri* CPMR1701.

—End of the English version—

-----*-----

un efecto negativo sobre la viabilidad de conidios. Este es el primer reporte del efecto antifúngico de los extractos metanólicos de *Capsicum* spp. sobre *M. royeri* CPMR1701.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de investigación de posgrado No. 612517, otorgada a D. De la Cruz-Ricardez.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 256-267.
- Bacon, K. R., Boyer, C., Denbow, S., O'Keefe, A., Neilson, and R. Williams. 2017. Antibacterial activity of jalapeño pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) extract fractions against select foodborne pathogens. *Food Sci. Nutr.* 5: 730-738.
- Bateman, R. P., E. Hidalgo, J. García, C. Arroyo, M. ten Hoopen, V. Adonijah, and U. Krauss. 2005. Application of chemical and biological agents for the management of frosty pod rot (*Moniliophthora royeri*) in Costa Rican cocoa (*Theobroma cacao*). *Ann Appl Biol.* 147: 129-138.
- De la Cruz-Ricardez, D., L. C. Lagunes-Espinoza, C. F. Ortiz-García, y M. Pablo-Pérez. 2016. Actividad antifúngica *in vitro* del extracto acuoso y alcaloideo de *Lupinus* spp. en *M. royeri*. *Agroproductividad* 9: 3-9.
- Di Rienzo, J. A., F. Casanoves, M. G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, y C. W. Robledo. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> (Consulta: noviembre 2018).
- Evans, H. C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (*Monilia*) *royeri*. *Phytopathol. Papers* 24: 44.
- Gurnani, N., M. Gupta, D. Mehta, and B. K. Mehta. 2016. Chemical composition, total phenolic and flavonoid contents, and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of crude extracts from red chilli seeds (*Capsicum frutescens* L.). *J. Taibah Univ. Sci.* 10: 462-470.
- Lipa, J. J., i K. Slizynsky. 1973. Wskazówki metodyczne I terminologia dowyznaczenia snedniej dawki swiertelnej (LD₅₀) w patologii owadów i toksykologii [Methodological instructions and terminology for determination of average lethal dose (LD₅₀) in insect pathology and toxicology]. *Prace Nauk. Inst. Ochr. Roslin* 15: 59-83.
- Martinelli, L., J. M., Rosa, C. dos S. B. Ferreira, G. M. da L. Nascimento, M. S. Freitas, L. C. Pizato, W. de O. Santos, R. F. Pires, M. H. Okura, G. R. P. Malpass, and A. C. Grana. 2017. Antimicrobial activity and chemical constituents of essential oils and oleoresins extracted from eight pepper species. *Cienc. Rural* 47: 1-7.
- Ngai, P. H. K., and T. B. Ng. 2007. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 366-370.
- Ortiz-García C. F., M. Torres-De la Cruz, y S. C. Hernández-Mateo. 2015. Comparación de dos sistemas de manejo del cultivo del cacao, en presencia de *Moniliophthora royeri*, en México. *Rev. Fitotec. Mex.* 38:191-196.
- Phillips-Mora, W., A. Arciniegas-Leal, A. Mata-Quiros, and J. C. Motomajor-Arias. 2012. Catálogo de clones de cacao seleccionados por el CATIE para siembras comerciales. Turrialba, Costa Rica: CATIE. 68 p. http://www.worldcocoaoundation.org/wp-content/uploads/files_mf/philippsmora2012clones4.64mb.pdf. (Consulta: diciembre 2018).
- Phillips-Mora, W., A. Coutiño, C. F. Ortiz, A. P. López, J. Hernández, and M. C. Aime. 2006. First report of *Moniliophthora royeri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cacao in Mexico. *Plant Pathol.* 55: 584.
- Prado-Urbina, G., L. C. Lagunes-Espinoza, E. García-López, C. C. Bautista-Muñoz, W. Camacho-Chiu, F. Mirafuentes G, y V. H. Aguilar-Rincón. 2015. Germinación de semillas de chiles silvestres en reapuesta a tratamientos pre-germinativos. *Ecosist. Recur. Agropec.* 2: 139-149.
- Ramírez, G. S., O. López B., T. Guzmán H., S. Munguía U., and S. Espinosa Z. 2011. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora royeri* (Cif & Par) Evans *et al.* *Tecnol. Marcha* 24: 3-17.
- Reyes-Figueroa, O., C. F. Ortiz-García, M. Torres-De la Cruz, M., L. C. Lagunes-Espinoza, and G. Valdovinos-Ponce. 2016. *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora royeri*. *Rev. Chapingo Ser. Cienc. For. Ambient.* 22: 149-163.
- Rodríguez-Maturino, A., R. Troncoso-Rojas, A. Sánchez-Estrada, D. González-Mendoza, E. Ruiz-Sanchez, R. Zamora-Bustillos, C. Ceceña-Duran, O. Grimaldo-Juarez, y M. Aviles-Marina. 2015. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Rev. Argent. Microbiol.* 47: 72-77.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 299: 152-178.
- Tamayo-España, L. E., S. I. Ramírez-González, O. López-Báez, R. R. Quiroga-Madrigal, y S. Espinosa-Zaragoza. 2016. Extractos por destilación de *Origanum vulgare*, *Tradescantia spathacea* y *Zingiber officinale* para el manejo de *Moniliophthora royeri* de *Theobroma cacao*. *Rev. Mex. Cienc. Agric.* 7: 1065-1076.
- Torres-De la Cruz, M., C. F. Ortiz-García, D. Téliz-Ortiz, A. Mora-Aguilera, and C. Nava-Díaz. 2011. Temporal progress and integrated management of frosty pod rot (*Moniliophthora royeri*) of cocoa in Tabasco, Mexico. *J. Plant Pathol.* 93:31-36.
- Torres-De la Cruz, M., C. F. Ortiz-García, D. Téliz-Ortiz, A. Mora-Aguilera, y C. Nava Díaz. 2013. Efecto del azoxystrobin sobre *Moniliophthora royeri*, agente causal de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*). *Rev. Mex. Fitopatol.* 31: 65-69.
- Velázquez-Ventura, J. C., C. Márquez-Quiroz, E. De la Cruz-Lázaro, R. Osorio-Osorio, and P. Preciado-Rangel. 2018. Morphological variation of wild peppers (*Capsicum* spp.) from the state of Tabasco, Mexico. *J. Food Agric.* 30: 115-121.
- Villamil, C. J. E., S. E. Viteri R., y W. L. Villegas O. 2015. Aplicación de antagonistas microbianos para el control biológico de *Moniliophthora royeri* Cif & Par en *Theobroma cacao* L. bajo condiciones de campo. *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* 68: 7441-7450.