

**EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Lippia origanoides* EN EL  
CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS (*Fusarium* sp., y  
*Colletotrichum* sp.) EN EL CULTIVO DE AJÍ CAYENA *Capsicum  
annuum***

**ANGELICA GUERRERO LOPEZ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADOS  
PALMIRA  
2012**

**EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE *Lippia origanoides* EN EL  
CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS (*Fusarium* sp., y  
*Colletotrichum*) EN EL CULTIVO DE AJÍ CAYENA *Capsicum annum***

**ANGELICA GUERRERO LOPEZ**

**Trabajo de tesis para optar al título de Magíster en Ciencias Biológicas  
con énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales**

**DIRIGIDO POR:**

**MANUEL SALVADOR SANCHEZ, MSc**

**CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA, PhD**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADOS  
PALMIRA  
2012**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN RECURSOS FITOGENÉTICOS  
NEOTROPICALES

En Palmira a los 07 días del mes de Diciembre de 2012, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores: EYDER DANIEL GÓMEZ y CARLOS ALBERTO HUERTAS

Para calificar la Tesis de Grado de:

**ANGÉLICA GUERRERO LÓPEZ**

Titulada:

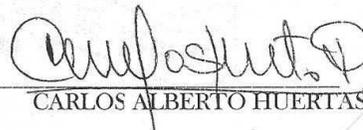
"EVALUACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LIPPIA ORIGANOIDES EN EL CONTROL DE HONGOS FITOPATOGÉNICOS (*Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp.) EN EL CULTIVO DE AJÍ CAYENE *Capsicum annum*" bajo la dirección de los profesores CARLOS GERMAN MUÑOZ PEREA PhD y MANUEL SALVADOR SÁNCHEZ, M.Sc.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores EYDER DANIEL GÓMEZ y CARLOS ALBERTO HUERTAS y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADO

REPROBADO

  
EYDER DANIEL GÓMEZ

  
CARLOS ALBERTO HUERTAS

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la fortaleza y guiar mi camino

A mi madre que es el mejor regalo de Dios, razón de mi esfuerzo y motivación para seguir adelante.

A mi padre y a su esposa Deisy; a mis hermanos Gabriela, Luciana, Emmanuel, a mis abuelos, a mi tía Yolanda; por su cariño y apoyo incondicional en mi formación profesional.

A todos mis amigos y compañeros con quienes compartí muchos momentos especiales.

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor expresa sus agradecimientos a:

Manuel Salvador Sánchez por dirigir mi tesis y facilitar los recursos necesarios para el desarrollo de la misma.

Carlos German Muñoz por su disposición y aportes en el desarrollo de este trabajo.

Al grupo de investigación de Plantas Medicinales y Aromáticas.

Al Doctora Nora Cristina Mesa Decana de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

A Héctor por su colaboración en la ejecución del trabajo en invernadero.

A Alexandra, Johannes, Nubia y Fernando por su colaboración en los trabajos de Laboratorio y campo.

Agradezco a todos mis profesores por sus conocimientos ofrecidos, y a todos aquellos que estuvieron involucrados en el desarrollo de las actividades de esta investigación.

A mi Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, que la llevo en mi corazón por darme la formación académica.

## Contenido

RESUMEN.....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	11
2. Justificación .....	156
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	178
4. Hipótesis .....	201
5. OBJETIVO GENERAL.....	22
5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	212
6. REVISION DE LITERATURA .....	223
6.1 Los Aceites Esenciales .....	223
6.2 <i>Lippia origanoides</i> HBK .....	2930
Aspectos Generales .....	290
EL Género <i>Lippia</i> .....	301
Quimiotipos .....	301
Aceite Esencial de <i>Lippia origanoides</i> HBK .....	312
El Cultivo del Ají ( <i>capsicum annum</i> L) .....	323
Descripción .....	323
Importancia .....	334
Producción .....	345
Enfermedades del cultivo de ají .....	356
Países Productores .....	378
Mercado .....	389
6.3.7 Investigaciones sobre el cultivo de ají .....	3940
7. MATERIALES Y METODOS .....	412
Localización .....	412
Recolección del Material Vegetal de <i>L. origanoides</i> .....	412
Extracción de los Aceites Esenciales .....	412

Preparación de las Soluciones .....	423
Establecimiento del Cultivo de Ají Cayena ( <i>Capsicum annuum</i> ) .....	423
Semillero .....	423
Trasplante .....	423
Elaboración de la suspensión de esporas .....	434
Ensayo Bajo Condiciones de Laboratorio .....	434
Tratamientos .....	434
Diseño Experimental .....	445
Variables de Respuesta .....	445
Forma de Análisis .....	456
Ensayo Bajo Condiciones de Invernadero .....	456
Tratamientos .....	456
Diseño Experimental .....	456
Variables de Respuesta .....	467
Forma de Análisis .....	467
Procedimiento .....	478
8. RESULTADOS Y DISCUSION.....	4950
Efecto del Aceite Esencial de <i>Lippia organoides</i> Sobre el Crecimiento de <i>Fusarium</i> sp., y <i>Colletotrichum</i> sp .....	490
Eficiencia del Aceite Esencial de <i>Lippia organoides</i> sobre el Control de <i>Fusarium</i> sp.,y <i>Colletotrichum</i> sp .....	578
Efecto de las Concentraciones de aceite esencial de <i>Lippia organoides</i> en el Control de <i>Fusarium</i> sp., y <i>Colletotrichum</i> sp., bajo condiciones de Invernadero .....	645
9. Conclusiones .....	701
10. Bibliografía .....	712

## RESUMEN

El cultivo de ají cayena, *Capsicum annum* L es de gran importancia a nivel mundial debido a su valor y uso, alimenticio, medicinal e industrial. Este cultivo presenta una serie de enfermedades limitantes como marchitez, agente causal *Fusarium* sp., y Antracnosis causada por *Colletotrichum* sp., Por esta razón se busca el control de estas dos enfermedades; Los aceites esenciales son sustancias orgánicas que se caracterizan por presentar olor, sabor y muchas veces propiedades antifúngicas, estas sustancias son producidas por plantas aromáticas y medicinales. Estudios realizados con los aceites esenciales de *Lippia origanoides* sobre hongos, han mostrado halos de inhibición en placas de agar donde estos microorganismos crecen, por lo que despierta el interés en determinar que efecto tiene el aceite en cada uno de estos hongos. El objetivo de la investigación fue Identificar la concentración apropiada del aceite; se realizaron aislamientos del banco de hongos del laboratorio de fitopatología de la universidad nacional sede Palmira. En condiciones de laboratorio se evaluaron seis concentraciones de aceite esencial de *Lippia origanoides*, 473.5, 236.75, 121.2, 60.6, 30.3 y 0.0 mg l<sup>-1</sup>, utilizando un diseño completamente al azar con cinco repeticiones; en condiciones de invernadero, se evaluaron dosis de 473.5, 236.75, y 0.00 mg l<sup>-1</sup>, de aceite, inoculando 120 plantas con los dos hongos fitopatógenos. Para el primer experimento, se utilizó como variable de respuesta, el crecimiento de los hongos fitopatógenos; en el caso del segundo ensayo, se midió la mortandad en términos porcentuales. Para los datos provenientes de los dos experimentos se realizó análisis de varianza, prueba múltiple de promedios de Tukey y análisis de regresión, utilizando el modelo logístico. Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS Versión 9.3.

**Palabras claves:** Ají Cayena (*Capsicum annum*), aceite esencial de *Lippia origanoides*, control de *Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp.

## ABSTRACT

The crop of Cayenne Pepper, *Capsicum annum* L is very important worldwide because of its value and use, as food, medical and industrial. This crop has a number of limitations such as wilt disease, causal agent *Fusarium* sp., And Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. For this reason people is looking for the control of these diseases. Essential oils are organic substances that are characterized for having smell, taste and frequently antifungal properties, these substances are produced by aromatic plants. Studies with essential oils of *Lippia origanoides* on fungi have shown inhibition zones on agar plates where these microorganisms grow, therefore it arouses interest about determining what effect has each of these fungi. The objective of the research was to identify the appropriate concentration of oil. Fungal isolates were performed from the fungi Bank of Plant- Pathology Laboratory of the National University of Colombia, city of Palmira. Under laboratory conditions were evaluated six concentrations of essential oil of *Lippia origanoides*, 473.5, 121.2, 60.6, 30.3 and 0.0 mg l<sup>-1</sup>, using a completely randomized design with five replications, under greenhouse conditions, doses of 473.5, 236.75, and 0.00 mg l<sup>-1</sup>, of oil were evaluated, inoculating 120 plants with the two phytopathogenic fungi. In the first experiment the growth of phytopathogenic fungi was used as the response variable; in the second experiment the mortality was measured in percentage terms. For the data from the two experiments was performed an analysis of variance, multiple test averages of Tukey and regression analysis, using the logistic model. For data processing was used the statistical package SAS, Version 9.3.

**Keywords:** Cayenne Pepper (*Capsicum annum*), essential oil of *Lippia origanoides*, control of *Fusarium* and *Colletotrichum*

## 1. INTRODUCCIÓN

Todas las especies del género *Capsicum*, a excepción de *C. anomalum*, son originarias de América. La distribución precolombina de *Capsicum* se extendió probablemente desde el borde más meridional de los EE.UU. a la zona templada cálida del sur de Sud América (Heiser, 1970) citado por Nuez, Gil y Costa 1996.

Este género comprende más de treinta especies de las cuales cinco han sido domesticadas dando origen a numerosos cultivares (Vélez, 1991). Las especies *C. annuum* y *C. frutescens* son las más cultivadas en el mundo por el alto contenido en vitaminas A, C y calcio, además del contenido de capsaicina y alcaloides responsables del sabor picante (Nuez, Gil y Costa 1996).

En Colombia comercialmente se siembran los cultivares Tabasco, Cayena, Jalapeño y Habanero a partir de semillas introducidas, algunas de ellas, desde hace 30 años mantenidas bajo aumentos artesanales de semilla. La utilización del ají es primordialmente para procesamiento de pastas de exportación y en menor, salsas dulces y picantes.

Existen cuatro factores principales que determinan el alto rendimiento de los cultivos: uso de semilla de alta calidad genética, oportunas prácticas agronómicas, manejo, control de plagas y enfermedades e interacción genotipo ambiente.

El potencial genético de los cultivares de ají, expresado en rendimiento, productividad y calidad, se mantendrá en niveles eficientes, atractivos y rentables como consecuencia, no solo de las adecuadas prácticas agronómicas (preparación de suelo, siembra, manejo de agua, nutrición y

sanidad), sino, de la capacidad de respuesta de la semilla empleada en el establecimiento de los cultivos (Estrada, E. 2010)

El cultivo de *Capsicum annum* presenta una serie de enfermedades limitantes causadas por hongos bacterias y virus. Las producidas por hongos y bacterias se hacen agresivas especialmente en periodos de lluvias. Las enfermedades virales son transmitidas principalmente por insectos y continúa su diseminación por el manejo cultural que se hace del cultivo.

Algunas enfermedades de importancia reportadas por la Universidad de Caldas (1999) en el cultivo comercial de *ají cayena* son:

Enfermedades fungosas:

- *Colletotrichum capsici* = Antracnosis
- *Cercospora capsici* = Mancha de las hojas
- *Fusarium* spp= Pudrición y marchitamiento
- *Stemphylium solani* Weber = Mancha foliar grisácea (García, Muñoz 2010)

Recientes estudios se han encaminado hacia la actividad biológica de aceites y extractos naturales de plantas medicinales, como son los de *Lippia origanoides* sobre microorganismos patógenos (Ospina D, et al 2008).

De acuerdo a los resultados obtenidos por Potes 2006, se ha definido con certeza la existencia de dos quimiotipos de *L. origanoides*, a partir de las diferencias encontradas en la composición química de los aceites esenciales tanto de hojas como de flores de dos muestras cultivadas en condiciones del Valle del Cauca. Uno de los quimiotipos presenta como componentes mayoritarios timol (45%),  $\gamma$ -terpineno (13,5%) y p-cimeno (10,0%), mientras que el otro quimiotipo presenta en mayor porcentaje *trans*- $\beta$ -cariofileno

(17%),  $\alpha$ -humuleno (13,2%) y ( $\beta$ + $\alpha$ )-eudesmol (8,3%). En Santander, también reportan para esta especie diferentes quimiotipos, uno con componente mayoritario *p*-cimeno (13%) y otro con mayor presencia de timol (56%). En Brasil reportan para esta especie un quimiotipo cuyo componente mayoritario es el carvacrol (42.9%), mientras que el timol se encuentra en menor porcentaje (8.4%) (Ruiz, 2008).

Lucini *et al.* (2006) evaluaron el efecto de monoterpenos sobre el desarrollo de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* concluyendo que el crecimiento micelial y el desarrollo de los esclerocios se ven afectados por estos compuestos.

Pinto *et al.* (1998) reportaron inhibición total del crecimiento micelial y germinación de esclerocios de *S. cepivorum* cuando se emplearon extractos de acetona-agua de *Eucalyptus citriodora* a 1000 y 10000ppm en un ensayo *in vitro*.

Los estudios en *L. origanoides* se han encaminado más hacia la actividad antibiótica y antiparasitaria de sus aceites esenciales, aunque existen reportes de actividad fungitóxica en hongos de plantas (Ospina, et al 2008).

Este comportamiento fue observado igualmente por (Oliveira, *et al* 2004) quienes atribuyeron la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *L. origanoides* a su contenido de carvacrol y timol, sobre algunas bacterias y levaduras.

En cuanto a ensayos sobre hongos patógenos de plantas de cultivo, se tiene la referencia de (Sanabria, *et al* 2005) quienes evaluaron el efecto de extractos de *L. origanoides* y otras 2 especies sobre la Rizoctoniosis, la Mancha Sureña del Maíz y los patógenos que la causan. El ensayo se hizo “*in vitro*” e “*in vivo*” con plantas de maíz en vivero; los resultados mostraron

disminución de la infección y retardo en la germinación de los conidios de los hongos cuando se hicieron aplicaciones de extractos de *L. origanoides*, llegando a concluir que existe potencial de uso de extractos vegetales como alternativa para el control de enfermedades de plantas.

Dentro de este grupo de componentes de los aceites esenciales, los sesquiterpenos también han exhibido actividad antifúngica contra fitopatógenos. Al  $\beta$ -cariofileno y óxido de cariofileno se les atribuye la actividad inhibitoria mayor del 80% a concentraciones de 100-250 ppm sobre hongos patógenos de plantas como *Corticium rolfsii*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*. Aceites esenciales de naturaleza sesquiterpénica, como los de algunas especies de *Hypericum heterophyllum* fueron evaluados en contra de hongos patógenos de plantas cultivadas, como *Fusarium sp.*, y *Rhizoctonia solani*, encontrándose resultados significativos (Ospina, *et al* 2008).

En este contexto, los aceites esenciales son una interesante alternativa a explorar, donde investigaciones acerca de su actividad biológica han demostrado que son capaces de remplazar con seguridad parcial o total a insecticidas y fungicidas sintéticos (Regnault-Roger, 1997; Isman, 2000; Cakir *et al.*, 2005 (Rodríguez A. 2010)

Debido a la mezcla de componentes presentes en los aceites esenciales, son considerados de bajo riesgo en el desarrollo de resistencia en patógenos, ya que cada uno de los componentes tiene su propia contribución a la actividad biológica (Daferera *et al.*, 2003; Yahyazadeh *et al.*, 2008), y es difícil correlacionar la acción de un único compuesto o clases de compuestos, debido que los efectos antimicrobianos, antimicóticos y el potencial fungitóxico son el resultado del actuar sinérgico de los constituyentes, (Rodríguez, *et al* 2010).

Diversos estudios avalan el potencial de la actividad antifúngica de los aceites esenciales (Daferera et al., 2003; Cakir et al., 2005; Soylu et al., 2007; Feng y Zheng, 2007; Yahyazadeh et al., 2008), su efecto de control en hongos de poscosecha (Szczurbanik et al., 2007; Tzortzakis y Economakis, 2007), su actividad fungistática y fungicida (Szczurbanik et al., 2007), como también sus propiedades antibacteriales (Dorman y Deans, 2000; Burt, 2004) e insecticidas (Regnault-Roger, 1997; Isman, 2000).

Los estudios biológicos y químicos de las plantas medicinales y aromáticas son útiles para comprender, apreciar su diversidad biológica y revelar su composición química. Por esto es interesante explorar en mayor profundidad el potencial de estas especies como fuente de fungicidas naturales. (Rodríguez A. 2010).

## 2. Justificación

Debido a las condiciones climáticas del trópico el ají es afectado por muchas enfermedades, especialmente por virus, hongos y bacterias. Las enfermedades causadas por hongos se hacen más agresivas en épocas de lluvia causando pérdidas de 40 y 70 %.

La oferta de ají en Colombia se caracteriza por ser un cultivo de alta sensibilidad a condiciones climáticas; esta circunstancia de incertidumbre en la oferta, se enfrenta a una demanda mundial creciente y variada teniendo en cuenta que el ají ya no es solamente un condimento de la gastronomía sino que se ha introducido con fuerza en la industria cosmética, farmacéutica y agroquímica. Colombia encuentra buenas oportunidades en esta ampliación de la demanda, sobre todo porque ha venido especializando zonas de producción como el Valle del Cauca y la Costa Atlántica alrededor de las grandes industrias de ají, que a su vez se convierten en centros generadores de empleo especialmente en la etapa de cultivo (una hectárea genera en promedio 1600 jornales año). La salsa de ají es importante porque en el conjunto de esta industria, es el producto que tiene la mayor capacidad de agregar valor y el segundo en valor exportado después de la pasta de ají (Hugo Restrepo & Cía. 2011)

El ají cuenta además con un extenso número de usos: se consume en el sector alimenticio en fresco o procesado como condimento; se utiliza en el sector farmacéutico, principalmente para aliviar lumbagos, artritis o tortícolis; en el sector cosmético, con el fin de elaborar lociones para el crecimiento del cabello, cremas reductoras; además, se utiliza como insumo en la agricultura ecológica para el manejo integrado de plagas (FAO, 2007).

De acuerdo con la FAO, en el año 2007 se sembraron en el mundo, aproximadamente tres millones de hectáreas entre ajíes secos y verdes; se destaca la participación China con un porcentaje del 23% del área total sembrada, seguida de la India que participó con el 17% y Etiopía con el 12%. Corresponde a China 693.200 hectáreas, India 500.000 y Etiopía 355.000 hectáreas. En América Latina, la mayor participación la tienen México y Perú, con 130.000 y 21.500 hectáreas respectivamente.

En 2008 fueron sembradas aproximadamente 600 hectáreas destinadas a la producción de ají para la industria exportadora en Colombia.

En Colombia el Pimentón y el Ají son cultivos relativamente recientes y comienzan a expandirse en vista de su buena rentabilidad, producción y posibilidades para exportación. Actualmente las zonas de producción comercial en Colombia se ubican principalmente en los departamentos de Santander, Valle del Cauca y Costa Atlántica.

Por ser el ají un cultivo de importancia económica tanto a nivel nacional como internacional, se hace necesario buscar alternativas de control más eficientes, bajando los costos de producción y ecológicamente viables. Los aceites esenciales de *Lippia origanoides* han mostrado ser una alternativa para el control de hongos fitopatógenos en plantas.

Los productos de origen biológico como alternativa para el control de plagas y enfermedades hacen parte de las prácticas de innovación para la agricultura sostenible y competitiva. La investigación, desarrollo, diseño y formulación de productos fungistáticos de origen biológico son estrategias que impactan positivamente la salud, tanto de los operarios agrícolas como para el consumidor final (Ospina - Álvarez 2011).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En general las enfermedades, son particularmente el principal problema en la producción de ají en el mundo.

Seguramente habría que situar en primer lugar a las enfermedades causadas por virus, además podemos concluir que las enfermedades del ají varían dependiendo la zona climatológica y condiciones en que se encuentre el cultivo, la importancia de las enfermedades varían de unas zonas a otras.

**Enfermedades más comunes en los cultivos de ají y pimentón en el valle del cauca**

Problema	Causa	Manejo
Pudrición de plántulas	Complejos de hongos del suelo <i>Fusarium</i> sp. , <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Phythium</i> sp.	Lotes nuevos, rotación, drenaje adecuado. Aplicación de microorganismos antagónicos (Trichoderma). Uso de aplicaciones líquidas (Drench) de fungicidas como: Propamocarb, Carboxin, Metalaxil, Focetil.
Secadera o tristeza	<i>Phytophthora capsici</i> .	Eliminación de restos de cosecha, anteriores distancias de siembra que permita buena aireación. Manejo adecuado del riego. Aplicaciones de Metalaxil, Propineb-Cymoxanil, Clorotalonil, Benomil.
Chancro bacteriano	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Rotación de cultivos Control de excesos de agua. Evitar daños mecánicos Evitar riegos por aspersión.
Nematodos	<i>Meloidogyne</i> sp.	Eliminación de restos de cosecha, del suelo Aplicación de nematicidas
Cercos poriosis	<i>Cercospora capsicii</i> .	Desinfección de semillas. Rotación de cultivos Aplicación de Maneb, Mancozeb, Carbendazim, Benomil, Clorotalonil

(Vallejo y Estrada, 2004)

Actualmente se ha implementado la utilización de aceites esenciales de *L. origanoides*, en el control de enfermedades en diferentes cultivos mostrando una capacidad inhibitoria sobre varios hongos fitopatógenos.

Los estudios realizados en torno al efecto de los extractos vegetales sobre agentes patógenos de plantas han mostrado el gran potencial como métodos de control, así como su poder fungistático y antifúngico (Ruiz C, 2008).

Los plaguicidas sintéticos han generado beneficios en la producción agrícola; sin embargo, el empleo inadecuado de los mismos, expresado en términos de tipo, toxicidad, número de aplicaciones y dosificación han producido contaminaciones que afectan al suelo, agua, aire y productos agrícolas, por la acumulación de residuos potencialmente dañinos a la salud humana y de los animales (Dinham y Malik, 2003).

El interés por el uso de los extractos vegetales (EV) con este fin se ha incrementado considerablemente, con prometedores resultados de investigaciones *in vitro* e *in vivo*, con especies de plantas de diferentes ambientes ecológicos y abundantes en la naturaleza (Satufer *et al.*, 2000; Rodríguez y Montilla, 2002; Zapata *et al.*, 2003; Araujo *et al.*, 2008; Rodríguez y Sanabria, 2005; Henríquez *et al.*, 2005, (Penz & Sacc 2009).

El control de la antracnosis se realiza con la aplicación programada de diversos fungicidas, durante la fase productiva (Avilán *et al.*, 1996) o en los frutos ya cosechados (Arias y Carrizales, 2007). Las restricciones en muchos países exigen la limitación en el uso de estos productos, por razones toxicológicas y ambientales, lo que obliga a realizar investigaciones y a desarrollar métodos de controles alternativos y/o complementarios al uso de agroquímico (Penz & Sacc 2009).

Entre los extractos vegetales que han mostrado efectos en el control de plagas agrícolas están los de *Lippia origanoides* Kunth, Verbenaceae, contra *B. maydis*, *R. solani* (Rodríguez y Sanabria, 2005), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Henriquez *et al.*, 2005) y *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Araujo *et al.*, 2008); los de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp., Fabaceae, contra *Sclerotium rolfsii* (Torrealba, 2006) y los de *Heliotropium indicum* L., Boraginaceae, contra *Mycosphaerella fijiensis* (Hernández *et al.*, 2005). Estas experiencias demuestran la posibilidad de uso de estas plantas para el control de otros patógenos (Penz & Sacc 2009).

Compuestos biológicamente activos obtenidos a partir de fuentes naturales son de interés para los investigadores que trabajan en el control de enfermedades infecciosas tanto para el hombre como para las plantas (Clark y Hufford, 1993). En los últimos años el interés por la evaluación de extractos de plantas, especialmente aquellas que presentan actividad contra fitopatógenos (Ospina *et al.*, 2011).

#### 4. Hipótesis

**Ho:** Ninguna de las concentraciones de aceites esenciales de *Lippia origanoides* tiene efecto significativo en el control de hongos fitopatógenos (*Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.*) in vitro o en invernadero.

**Ha:** Al menos una de las concentraciones de aceites esenciales de *Lippia origanoides* tiene efecto significativo en el control de hongos fitopatógenos (*Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.*) in vitro o en invernadero.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades fungicidas del aceite esencial de *Lippia origanoides* sobre los hongos fitopatógenos (*Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp.), en el cultivo de ají cayena, *Capsicum annuum*. *In vitro* y en invernadero.

### 5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Extraer por medio de arrastre con vapor el aceite esencial de *Lippia origanoides*, para las respectivas aplicaciones en el cultivo a evaluar.
- Evaluar la concentración adecuada del aceite esencial de *Lippia origanoides*, en el control de hongos fitopatógenos cultivo de ají en invernadero.
- Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *L. origanoides*, en el cultivo de ají cayena

## 6. REVISION DE LITERATURA

### Los Aceites Esenciales

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser (Martínez A, 2001)

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos.

En esencia los aceites esenciales son sustancias que se caracterizan por presentar olor, sabor y muchas veces propiedades antibióticas, siendo producidas por muchas plantas aromáticas (Méndez – Serrano 2007).

Los aceites esenciales, son líquidos aromáticos obtenidos de diferentes partes de las plantas y utilizados ampliamente como saborizantes y en la industria de los perfumes (Ramírez – Isaza 2009).

Se ha demostrado que algunos aceites poseen actividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, insecticida, antitóxica y propiedades antioxidantes, otros aceites han sido usados en el tratamiento de cáncer, (Ramírez – Isaza 2009).

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

De acuerdo a la naturaleza química de sus componentes mayoritarios, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que están en mayor porcentaje. Según esto, los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p. ej. clavo, canela, anís, etc.), (Ospina D, 2008).

Los aceites esenciales se utilizan ampliamente en cosmética, perfumería, fitoterapia y en alimentos como saborizantes, por esta razón, poseen una gran demanda internacional, principalmente, en los países desarrollados. Su obtención se realiza principalmente por hidrodestilación o arrastre con vapor, métodos industriales, relativamente económicos y fáciles de implementar.

El valor económico y la aplicabilidad industrial de las esencias están directamente relacionados con su composición química, que determina todas las propiedades (físicoquímicas, organolépticas, etc.) y las actividades (antioxidantes, antimicrobiales y antifúngicas), (Ruiz, 2008).

Las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales y sus componentes son utilizadas en diversos productos comerciales tales como selladores dentales de canal radicular, antisépticos y suplementos alimenticios para cerdas lactantes y lechones destetados. Algunos conservantes que contienen aceites esenciales ya están disponibles

comercialmente, para su uso en la industria de alimentos, (Ramírez – Isaza 2009).

Estudios realizados con los aceites esenciales *Protium heptaphyllum* y *Lippia origanoides* sobre bacterias Gram negativas hongos y levaduras, han producido halos de inhibición en las placas de agar donde estos microorganismos se han crecido, por lo que se despertó el interés en determinar que efecto tienen cada uno de estos aceites sobre la *Nocardia otitidiscaviarum* GAM- 5, la *Nocardia asteroides* GUH-2 y la *Nocardia brasiliensis* G-17 , ya que estas especies de nocardias infectan tanto a los humanos como a los animales, produciendo infecciones agudas (nocardiosis) o crónicas (actinomicetoma). Se probó la actividad biológica de los aceites esenciales *Protium heptaphyllum* y *Lippia origanoides* sobre cada una de las especies de nocardias mencionadas, encontrándose halos de inhibición característicos del efecto inhibitorio del aceite esencial en placas de agar con GAM-5 y G-17 (Méndez *et al*, 2007).

Las enfermedades producidas por enterobacterias (*Escherichia* y *Salmonella*) generalmente están asociadas con la ingesta de alimentos contaminados; las enterobacterias causan gastroenteritis y diarrea siendo responsables de tasas de mortalidad altas, con más de 50000 muertes diarias, como consecuencia de estas infecciones. El surgimiento de cepas resistentes a antibióticos se ha convertido en un serio problema de salud y ha obligado a la búsqueda de nuevas fuentes de éstos, encontrándose en los aceites esenciales un alto potencial para ello. (Ramírez *et al*, 2009).

Las plantas del género *Lippia* (*Verbenaceae*) han sido utilizadas para propósitos medicinales en muchos países, varias actividades biológicas tales como antibacteriana, antiparasitaria, antiviral y antimicótica, En África especies de *Lippia* sp., se usan contra la malaria; (Ramírez *et al*, 2009).

Los extractos como los aceites *Lippia origanoides* HBK son utilizados comúnmente en la medicina tradicional para el tratamiento de la influenza, resfriados e infecciones pulmonares (resfriado, gripe, bronquitis y asma) como tónico contra el dolor de estomago, algunas especies se han usado contra la diarrea y la disentería. (Ramírez *et al*, 2009).

Compuestos biológicamente activos que proceden de fuentes naturales han sido siempre de gran interés para los científicos que trabajan en enfermedades infecciosas. (Ramírez *et al*, 2009). Las especies aromáticas y medicinales contienen gran cantidad de fitoquímicos bioactivos útiles para diferentes tipos de industrias, entre estas, agrícola, de alimentos, farmacéutica, cosmética, etc. (Vega N, 2011).

Se evaluó la capacidad in vitro de aceites esenciales obtenidos de hojas y flores de diferentes muestras de *Lippia origanoides*, para inhibir el crecimiento micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, patógeno causante de la pudrición blanca en cebolla. El aceite evaluado mostró efecto inhibitorio tanto en el crecimiento micelial como en la formación de esclerocios, en concentraciones de 250 - 1350  $\mu\text{L/L}$ . (Ospina - Álvarez 2011).

Investigaciones en Indígenas del Sur África establecieron y compararon los metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de *Lippia* sp., se utilizan en forma de infusiones con fines medicinales para los problemas gastrointestinales y respiratorios; en los extractos de plantas evaluadas se encontraron actividades antibacteriana, antioxidantes, antiinflamatorias y antifúngicas (Amukohe E, 2008).

Se evaluó la composición química, actividad antifúngica y citotóxica de aceites esenciales obtenidos de *L. origanoides* con respecto a la presencia de sus principales componentes; fuerte actividad antimicótica del aceite esencial de *L. origanoides* contra *A. fumigatus* ha dado un nuevo valor agregado a este producto natural (Betancur-Galvis, 2011).

Se midió la actividad repelente de los aceites esenciales frente a la especie *Tribolium castaneum*, Herbst, una de las principales plagas de cereales y productos almacenados, esto fue determinado por las concentraciones del aceite capaces de repeler el 50% de los insectos (CR50). Los AE con mayor repelencia fueron los extraídos de *Lippia origanoides* y *Citrus sinensis*, (Olivero-Verbel, 2009).

Compuestos botánicos con actividades insecticidas y acaricidas se han utilizado en el control de plagas; la toxicidad de los extractos etanólicos obtenidos de orégano silvestre (*Lippia origanoides*), fueron evaluados en diferentes concentraciones a Poblaciones de ácaros recogidos de plantas de frijol negro con diferentes niveles de éxito, (Sivira- Sanabria 2010).

Se evaluó *in vitro* el efecto citotóxico y la actividad antiviral sobre el virus de la fiebre amarilla (YF-17DD) de aceites esenciales extraídos de *Lippia origanoides*, usando el ensayo colorimétrico MTT y reducción del título viral (UFP/ml), Los resultados sugieren que estos aceites contienen agentes con potencial antiviral contra el virus de la fiebre amarilla que pueden ser explorados para el desarrollo de un remedio alternativo (Meneses R. 2007)

Para el control de la Sigatoka Negra en plátano se utiliza gran cantidad de agroquímicos, los cuales afectan la salud de los humanos, el ambiente y generan poblaciones resistentes del patógeno; con la finalidad de buscar alternativas de manejo de la enfermedad y utilizables en una estrategia

integrada, se evaluaron los extractos etanólicos (EE) de hojas de *Lippia origanoides*, Los EE fueron aplicados en dosis de 100 mL en 3500 mL de agua (2,86%) + 40 mL de aceite blanco; los resultados obtenidos mostraron el potencial antifúngico de los EE contra la Sigatoka Negra (Vargas – Rodríguez 2009).

El uso de los extractos vegetales (EV) en el control de enfermedades ha tomado auge y su aplicación constituye una alternativa importante en frutas para consumo fresco. En este sentido se consistió determinar el efecto de la aplicación de los EV de *Lippia origanoides*, sobre la calidad de frutas de mango (*Mangifera indica* L.) durante la poscosecha (Bolívar – Sanabria, 2009).

*Spongospora subterranea* es el agente causal de la sarna polvorienta de la papa (*Solanum tuberosum*), enfermedad que afecta directamente el valor comercial y productividad del cultivo, se evaluaron cinco fungicidas (mancozeb, azoxystrobin, propamocarb, difenoconazol y PCNB) y dos especies vegetales (*Lippia origanoides* Kunth y *Calotropis procera*) en dos formas, extractos etanólicos y polvos, los resultados obtenidos fueron la disminución de la severidad que permitió un aumento de los parámetros de producción del cultivo de tubérculos (Bittara – Rodríguez, 2009).

Se evaluó la capacidad antioxidante de los aceites esenciales de *Lippia origanoides* como medida de la capacidad antirradicalaria, citotoxicidad en células Vero y las actividades antifúngicas, antioxidantes, antiparasitaria y antibacterial; los resultados obtenidos permitieron establecer que este aceite tiene una alta actividad biológica en los diferentes ensayos (Celis C. 2007).

La actividad antibacteriana de los aceites fue evaluada por el método de perforación en placa de agar y la concentración mínima inhibitoria (MIC) fue determinada por el método de microdilución en caldo; los rangos de inhibición frente a los microorganismos evaluados estuvieron entre 14 y 105% con respecto a los antibióticos control, y las MIC entre 256 y 1024 ppm. Estos resultados indican que los aceites de *Lippia origanoides* pueden ser útiles en el desarrollo de compuestos antibacterianos (Ramírez – Isaza 2009).

*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. lycopersici*, *Fusarium* sp., y *F. cubense*, constituyen patógenos importantes en frutales, tomate y bananas, respectivamente. En la búsqueda de alternativas de control efectivas y sanas se evaluó el efecto in vitro, por separado, de los extractos de *L. origanoides* y *P. niruri* sobre estos hongos; *L. origanoides* fue más efectiva a menor concentración que *P. niruri*, induciendo entre 70 y 90% de inhibición. *F. oxysporum* f. sp., *cubense* y *C. gloeosporioides* fueron más susceptibles a ambos extractos (Sanabria – Rodríguez, 2006).

En los últimos años, ha habido un creciente interés en la evaluación de las plantas que poseen actividad antibacteriana contra diversas enfermedades, por lo que se evaluó la actividad antibacteriana de los aceites de *Lippia origanoides* obtenidos de especies de diferentes regiones de Colombia (Ramírez – Isaza 2009). Estos han mostrado bioactividad con resultados promisorios contra varios tipos de microorganismos de importancia económica. (Vega N, 2011).

## ***Lippia origanoides* HBK.**

### **Aspectos Generales**

*Lippia origanoides* H. B. K. es una planta perteneciente a la familia Verbenaceae. Es un arbusto aromático de hasta 3 m de altura, muy ramificado y leñoso, de hojas simples opuestas, inflorescencias racimosas dispuestas axilarmente con flores de color blanco. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce sobre aspectos básicos de su biología como son su diversidad y estructura genética. En Colombia, *L. origanoides* se distribuye en zonas áridas de la región Andina, valles interandinos y en la región de la Costa Atlántica. El conocimiento de cómo la diversidad genética se distribuye dentro y entre poblaciones es el primer paso para el eficiente aprovechamiento y conservación de los recursos Fitogenéticos promisorios. (Suarez – Ortiz 2009).

En los ecosistemas del neotrópico Colombiano se encuentran especies vegetales de gran valor para diferentes tipos de industrias como la química, farmacéutica, perfumería y agroquímica como es el caso de *L. origanoides* que produce un AE con alta actividad antifúngica y antibactericida (Blanco-Moreno 2006).

Se encuentra distribuida en el nordeste de Suramérica y Centroamérica, así como en las Antillas. *Lippia origanoides* Se conoce vulgarmente como orégano y orégano ancho. En Colombia suele encontrarse en algunas zonas de los valles secos interandinos de los departamentos de Cauca, Norte de Santander, Magdalena, Cundinamarca, La Guajira y Santander (Ospina D, 2008). Esta especie puede ser una gran alternativa para su producción agrícola, en zonas con suelos pobres y sequias prolongadas, para competir en el mercado de aceites esenciales, (Blanco-Moreno 2006).

## **EL Género Lippia**

Este género comprende más de 200 especies de plantas entre las que se encuentran hierbas, arbustos y pequeños árboles. Estas especies se distribuyen principalmente a través de países de Centro y Sur América, y territorios de África tropical. Muchas de estas plantas se utilizan para el tratamiento de enfermedades respiratorias y gastrointestinales, presentan diferentes actividades antibacteriales, antifúngicas y antivirales. Las partes aéreas de *Lippias* se utilizan como condimentos, y algunas revisten gran importancia económica, pues sus aceites esenciales tienen aplicaciones industriales, e.g. los aceites de *Lippia citriodora* y *Lippia graveolens*. (Ruiz, 2008).

### **Quimiotipos**

Son variaciones químicas naturales que suceden en el metabolismo secundario de las plantas, inducidas, quizá por factores ambientales (e.g. tipo de suelo, altitud, exposición al sol, lluvia, época de colecta, variaciones estacionales) que someten al individuo o a un grupo a una condición de estrés, lo que hace que su metabolismo produzca algunos metabolitos en mayor cantidad que otros (Ruiz C, 2008).

Esto no siempre puede ser cierto en su totalidad y las variaciones observadas puedan estar influenciadas también por factores genéticos.

Hay plantas que pueden presentar diferencias muy marcadas en la composición de su aceite con respecto a un compuesto en particular. Por ejemplo, el contenido de carvacrol en *Lippia origanoides* puede variar del 0,1 al 60%. En otros casos, la misma planta puede cambiar su apariencia, como *Lantana camara*, la cual presenta una variación en el color de sus flores

amarillo-naranja y rosado-violeta, así como en la composición de su aceite esencial (Ruiz C, 2008).

En Colombia se presume la existencia de dos o más quimiotipos de *L. origanoides*. El término quimiotipo o raza química se utiliza para hacer referencia al hecho de que existan perfiles distintos de composición química dentro de una misma especie vegetal, es decir el hecho de que dos plantas individuales de exactamente la misma especie botánica (o incluso subespecie) tengan composición química distinta (Ospina, 2008).

### **Aceite Esencial de *Lippia origanoides* HBK**

Las aplicaciones etnomédicas y biológicas de los aceites esenciales están directamente determinadas por su composición química, y ésta a su vez varía según la especie vegetal y las condiciones geobotánicas de cultivo; la extensa distribución de las plantas de la familia *Verbenaceae* en el territorio nacional motivó a evaluar la composición química de tres especies y correlacionarlas con sus propiedades biológicas. Los componentes mayoritarios identificados en los aceites de *L. origanoides* y *L. alba*, quimiotipos citral y carvona, corresponden a monoterpenos oxigenados (56, 67 y 44%, respectivamente), entre los cuales los aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados (neral, 19% y geranial, 23%), las cetonas cíclicas (carvona, 32% y piperitenona, 4%) y los compuestos fenólicos (timol, 14% y carvacrol, 33%), predominan en los aceites de *L. alba* quimiotipos citral y carvona, y *L. origanoides*, respectivamente (Celis C, 2007).

Los compuestos carvacrol, timol, pcimeno, ã-terpineno, â-mirceno, á-terpineno, trans-â-cariofileno, acetato de carvacrilo y acetato de timilo fueron identificados como los componentes mayoritarios en el aceite esencial de *L. origanoides*, independientemente de la época de colecta; el alto rendimiento

en la producción del aceite y la composición química no son afectadas por las épocas estacionales del año. (Blanco-Moreno 2006).

Carvacrol (38.6%); *p*-cimeno (10%) y timol (18.5 %). Actualmente, se conoce que el carvacrol y el timol presentan actividades antifúngica, antibacterial y antioxidante. La actividad antimicrobiana de aceites esenciales de especies aromáticas aparece asociada generalmente a los compuestos fenólicos. (Ruiz, 2008).

### **El Cultivo del Ají (*Capsicum annum*)**

#### **Descripción**

La taxonomía de la planta de Ají corresponde al filum Magnoliphita; clase, Magnoliopsida; orden solanales; familia, Solanaceae; y género *Capsicum*. La familia solanaceae, está formada por unos 90 géneros, los cuales se encuentran divididos en 2 subfamilias: Solanoideae y Cestroideae. La diferencia entre éstas se basa en los diferentes modelos de desarrollo del embrión, además de las diferencias morfológicas, químicas y citogenéticas. Para la primera familia el embrión está enrollado y es de diámetro uniforme. Para la familia Cestrídeae, el embrión es recto o ligeramente curvado (Molina D, 2009).

*Capsicum* es una de las tribus más grandes de la subfamilia Solanoideae, con 1250 especies, su taxonomía es compleja debido a la variabilidad de las formas existentes en las especies cultivadas y a la diversidad de los criterios utilizados en su clasificación (Molina D, 2009).

El ají picante de la familia Solanácea, pertenece al género *Capsicum*, que incluye entre 20 y 30 especies, y tiene su origen en las regiones tropicales y subtropicales de América, principalmente en países como Bolivia y Perú, donde se han encontrado semillas de formas ancestrales de más de 7.000

años. Al menos cinco de las especies de este género son cultivadas en mayor o menor grado pero, en el ámbito mundial, casi la totalidad de la producción está dada por una sola especie, *Capsicum annum*, a partir de la cual originan dos productos diferentes: El ají (fruto picante) y el pimiento o pimentón no picante.

El ají se destaca por su alto contenido de ácido ascórbico, valor que incluso es superior al de los cítricos. Posee un alto contenido de vitaminas A, B1, B2 y C; contiene más vitamina C que el tomate y tres veces más que la naranja y, además, son de elevada pungencia; aspecto que los caracteriza. (Hugo Restrepo & CIA 2011).

### **Importancia**

La demanda de ají picante es reconocida, en su mayoría, a escala industrial. En Colombia, principalmente en Medellín y en la Costa Atlántica, existen varias empresas dedicadas a la transformación del ají picante, para la elaboración de encurtidos, ya sean completos o en rajas, congelados, deshidratados, enlatados, pastas y salsas. Además, un uso muy importante es como materia prima para la obtención de colorantes y de oleorresinas e insecticida biológico.

Estudios recientes han considerado que el ají (*Capsicum annum* L.) pueden ser una fuente importante de compuestos. Se cuantificaron fenoles y flavonoides y se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos fenólicos de los cinco cultivares de ají por el método de quelación de los radicales libres 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) Y 2,2- azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS+); además se evaluó la capacidad de dichos extractos para inhibir la oxidación de colesterol.

Los compuestos fenólicos, tocoferoles y carotenoides son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como resultado de la

adaptación a condiciones de estrés. Estos compuestos han mostrado ser antioxidantes potenciales para proteger las células del ataque de los radicales libres asociados con la oxidación (Molina D, 2009).

### **Producción**

A nivel mundial, se cultivan más de 1.4 millones de hectáreas de los diversos tipos de ají verde; obteniéndose más de 15 millones de toneladas de producto. Entre los países productores más importantes destacan China, Turquía, México, Nigeria, España y Estados Unidos, los cuales en conjunto producen el 30% del total (Molina D, 2009)

Una característica importante del mercado global de ají es que los principales países productores no son, a excepción de México y España, los más destacados exportadores, ya que éstos destinan casi la totalidad de su producción al mercado interno. En cambio, como países exportadores sobresalen algunos países industrializados, los cuales a su vez suelen ser importadores importantes de este producto, caracterizándose por darle valor agregado al producto al exportarlo mayormente como producto envasado.

España, ocupa el primer lugar por su volumen exportado con más de 250 mil/ton, seguido por México (229 mil ton), Holanda (220 mil ton) y EUA (62 mil ton). Mientras que España y Holanda dirigen sus exportaciones hacia la Unión Europea, México orienta sus exportaciones hacia Estados Unidos y Canadá. Por su parte Estados Unidos, dirige sus exportaciones a países latinoamericanos, Europa y Asia.

Los principales países importadores son Alemania, Francia, Estados Unidos y Canadá, quienes representan el 70% del total de las exportaciones.

En su mayor parte importan los tipos no picantes o dulces, utilizando parte para consumo y parte para procesarlo antes de exportarlo como producto envasado (Sistema Producto Chile Verde Baja California Sur, 2003). (Molina D, 2009).

### **Enfermedades del cultivo de ají (*Capsicum annum*)**

Se han reportado como agentes causales del ahogamiento y marchitez del ají (*Capsicum annum*) a los siguientes hongos: *Fusarium* eqiseti, *F. Verticilloides*, *F. oxysporum*, *F. solani* (todos aislados de semilla). *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*. Estos hongos causan hasta un 70% de pérdidas en la producción (Gonzales *et al*, 2004).

Investigaciones para identificar morfológicamente y molecularmente por PCR: ITS (Internal Transcribed Spacer) a los agentes causales de la marchitez, e iniciar el estudio de algunos factores involucrados en la enfermedad; la hipótesis fue que el problema causado por un complejo de fitopatógenos fúngicos, y propiciado por factores de manejo del cultivo que favorecen la enfermedad (Gonzales *et al*, 2004).

*Fusarium* sp., crece dando una coloración blanca la cual produce un pigmento color vino que gradualmente se difunde en el medio. El micelio está formado por hifas septadas y los conidióforos presentan racimos de macroconidios. Se observan también clamidosporas y microconidios (Guzmán, 1977), Algunas especies de interés agrícola son *Fusarium oxysporum*, causante de la marchitez en algodón, en ají, el mal de Panamá en el banano y la podredumbre basal en frijol (Arias – Piñeros, 2008).

El ají se infecta no sólo por patógenos específicos de plantas de la familia Solanaceae, sino también por otros organismos; ellos son especies del

género *Fusarium* que sobreviven en el ambiente del suelo en una forma saprofita, micelio y clamidosporas (Nelson *et al.* 1983).

Enfermedades *del Capsicum annum*.

Marchitez y amarilleo de las hojas bajas, causada por *Fusarium sp.*, esta anomalía progresa hacia las hojas superiores. En la parte interna del tallo, a nivel del cuello, se observa una coloración marrón con destrucción del tejido y daño en las raíces. (Contreras – Fernández, 2011).

*Fusarium sp. Phytophthora Capsici Y Rhizoctonia Solani* son los principales agentes causales de la marchitez del ají que disminuye el rendimiento del cultivo. Lo cual ha originado la sustitución de cultivos y abandono de tierras. (Santos P, 2010).

Las pudriciones radicales que se presentan en el cultivo de ají, son las producidas por, *Fusarium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* y *Verticilium spp.* Se presenta con severidad en climas cálidos y suelos arenosos de las regiones templadas (Toto H, 1999).

Los primeros síntomas se manifiestan en un ligero aclaramiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes más externos, después ocurre epinastia de las hojas viejas ocasionada por el debilitamiento de los pecíolos. Mientras en la raíz muestra una mancha rojiza que luego toma una tonalidad de rojo oscuro a pardo se extiende hasta cubrir la raíz principal, mientras van muriendo las raicillas. La parte del tallo que se encuentra por debajo de la superficie del suelo al hacerle un corte transversal muestra un anillo de color café y rallas de color rojo (Toto H, 1999).

El marchitamiento causado por *Fusarium sp.*, se caracteriza por el achaparramiento de las plantas, las que en poco tiempo se marchitan y mueren; la marchitez se desarrolla con especial rapidez en la floración o

fructificación, Suelos ácidos deficientes en potasio, la fertilización con urea tienden a favorecer la enfermedad; se disemina por polvo, agua, equipo agrícola y plantas infectadas (Toto H, 1999).

*Fusarium oxysporum* responsable marchitamiento de la planta, así como *F. solani* causa pudrición a la raíz y la base del tallo (Kwaśna et al. 1991). También *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de la antracnosis en frutas y pudrición de la raíz de la pimienta (Dillard y Cobb 1998, Wagner et al. 2001 a, Jamiólkowska 2008), los análisis micológicos mostraron que las raíces y la base del tallo fueron colonizados principalmente por *Colletotrichum coccodes* y *Fusarium* sp. (Jamiólkowska – Poznan, 2009).

Antracnosis: *Colletotrichum* sp.

En los frutos se aprecian manchas negras, dándole mal aspecto a éstos. Las hojas se necrosan, apareciendo una coloración negra. (Contreras – Fernández, 2011).

En muchos países asiáticos la antracnosis, causada por *Colletotrichum acutatum*, causa una pérdida grave del rendimiento y afecta a la calidad del cultivo, además con grandes pérdidas económicas (Kim– Yoon, 2005).

El control de la antracnosis en el pimiento verde implica el uso de variedades resistentes y / o fungicidas (Silveira- Zamboni, 2004).

### **Países Productores**

China y México son los principales productores a nivel mundial y según cálculos de la CCI el área cosechada de ajíes en el ámbito mundial ascendió a 1.444.306 Has, con una producción de 18.902.340 toneladas; China produce aproximadamente 8 millones de toneladas, México ocupa el segundo lugar con cerca de 2 millones, seguidos por Turquía, España y

Estados Unidos. El comercio total creció en la década pasada a una tasa del 6,7% en valor y 7,9 % en volumen.

Los principales exportadores son los Países Bajos, España y México con más del 70% del mercado; Los principales importadores son Estados Unidos (32%) y Unión Europea (mas del 40%).

Los principales departamentos productores en Colombia son Valle, Bolívar, Atlántico, Magdalena y Guajira. (Hugo Restrepo & Cía. 2011)

### **Mercado**

No se comercializa el ají en el mercado local, las asociaciones de productores lo comercializan directamente con las empresas procesadoras, cuyo mercado es internacional, los precios locales de ají en salmuera (maneja el rango de variación del precio del dólar) oscilan entre US\$ 0.27 y US\$ 0.28 dólares / Kg, El precio del ají fresco, en las mismas condiciones de variación del precio del dólar, oscila entre US\$ 0.26 y US\$ 0.27 dólares /Kg, el aliado comercial propuesto es: La empresa C.I. Comexa S.A. con 12 años de experiencia en el procesamiento de ají de las diferentes variedades de ají picante (Tabasco, Jalapeño, Cayenne y Habanero).

- CI COMEXA SA. Exporta sus productos a más de 25 países del mundo. Sus plantas están localizadas en Cartagena y otra planta de procesamiento en la vía al municipio del Malambo (Atlántico).
- Procesa 1800 Ton / año de producto, representada en las 4 variedades principales de ají picante y ha identificado una demanda no satisfecha de la variedad de jalapeño del orden de 1200 toneladas para un periodo de dos años.

Existen por lo menos cinco especies del género Capsicum de importancia a nivel comercial, entre éstas Cayenne, Tabasco y Habanero, en Colombia el desarrollo del cultivo ha sido motivado por la demanda externa de países desde regiones como USA, UE, Oriente Medio entre otros, llegando a

exportaciones de US \$2,5 millones en el año 2005. (Hugo Restrepo & Cía. 2011)

### **Investigaciones sobre el cultivo de ají**

El ají (*Capsicum* sp.) se siembra como cultivo transitorio en zonas cafeteras donde se considera una alternativa productiva importante debido a su demanda en fresco y transformado. Aunque los agricultores poseen un amplio conocimiento empírico sobre el cultivo, hacen falta elementos científicos que permitan construir un paquete tecnológico apropiado a la región y que permita planear la producción (Flor-Ruiz, 2007).

Las variedades de ají cultivados (*Capsicum* spp.) Producen diferentes cantidades de capsaicina, son posiblemente asociadas con la resistencia a la antracnosis, enfermedad de pudrición de la fruta (Kraikruan – Sangchote, 2008).

El rendimiento de ají (*Capsicum* spp.) en el Valle del Cauca se debe a las fertilizaciones química, orgánica y biofertilización, Para los suelos estudiados se concluyó que el mayor rendimiento de ají se consigue cuando se aplica al suelo una fuente química completa, más una fuente de materia orgánica, más micorrizas arbusculares; Además, que la biofertilización es un complemento de la fertilización química (Rodríguez –Bolaños, 2010).

Se seleccionaron cinco accesiones de la colección de germoplasma de Capsicum Amazónico del Instituto Sinchi, por su alto grado de pungencia para evaluar su crecimiento y el efecto sobre los patrones de interceptación de la radiación fotosintéticamente activa (RFA), producción y calidad de los frutos bajo tres distancias de siembra (Castellanos – Barrera 2009).

Se estudiaron descriptores cuantitativos de las variedades comerciales Cayena, Tabasco y Habanero, relacionados con producción por planta, contenido de capsaicina y presencia de virus (*potyvirus*, *geminivirus*, *cucumovirus* y virus de mosaico del tabaco TMV) en 100 accesiones de *Capsicum* pertenecientes a la universidad nacional de Colombia (Pardey-García, 2009).

Se caracterizaron morfológicamente cien introducciones de *Capsicum*, recolectadas en Colombia (Zonas Andina, Caribe, Pacífica, Amazónica y Llanos Orientales) o introducidas de países centro y suramericanos a través del Banco de Germoplasma de USDA, se utilizaron 41 descriptores propuestos por el IPGRI (14 de caracteres vegetativos, 10 de inflorescencia y 17 de fruto y semilla); las estrechas distancias genéticas entre *C. annuum*, *C. frutescens*, y *C. chinense* permiten concluir que las tres conforman un grupo morfológico (Pardey- García, 2009).

Se realizó una caracterización morfológica de 93 accesiones de *Capsicum* spp., procedentes de 11 países (Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Guatemala, Guyana, México, Perú, Salvador) y representativas de 4 especies (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens*), se utilizaron 21 descriptores (6 cuantitativos y 15 cualitativos; 8 de caracteres vegetativos, 3 de flor y 10 de fruto y semilla) propuestos por el IPGRI (1983). La caracterización morfológica permitió confirmar la presencia de variabilidad dentro del género en especial los descriptores de arquitectura de planta, estructuras reproductivas y producción que explicaron el 78% de la variabilidad total (Palacios S, 2007).

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 Localización**

El ensayo *in vitro* se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología y la plantulación en el invernadero de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, localizada en la región sur del departamento del Valle del Cauca. Con coordenadas 331'48" N y 7681'13" W. Zona climática Bosque Seco Tropical (BS-T) de acuerdo con la clasificación de Holdridge, con altura de 1.100 msnm, La temperatura promedio es de 24°C, humedad relativa promedio del 65% y una precipitación anual aproximada de 1.200 mm.

#### **Recolección del Material Vegetal de *L. organoides***

El material vegetal de *L. organoides* se obtuvo de la colección de trabajo del grupo de investigación en Plantas Medicinales, Nativas, Aromáticas y Condimentarias ubicado en el Centro Experimental de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira (CEUNP), localizado en el municipio de Candelaria, a 1000 m.s.n.m., temperatura promedio de 24 °C y 900 mm de precipitación anual.

La colecta del material vegetal se realizó en horas de la mañana, recolectando la parte foliar de *L. organoides*, se separaron cuidadosamente las hojas sanas y se dejaron secar al aire durante 48 horas hasta que alcanzó una humedad cercana al 12 %.

#### **Extracción de los Aceites Esenciales**

La extracción de los aceites esenciales se realizó por arrastre con vapor en un equipo tipo Clevenger durante dos horas; los aceites obtenidos se

secaron con Sulfato de sodio anhidro (CARLO ERBA) y se almacenaron en nevera a 4°C hasta su evaluación en campo.

### **Preparación de las Soluciones**

La solución inicial se preparó disolviendo 150 µl del aceite esencial en 1,5 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) en un matraz volumétrico de 20 ml, completando a volumen con agua destilada. Para el medio de cultivo se preparó PDA debidamente estéril. A partir de la solución inicial se prepararon los tratamientos con las siguientes concentraciones finales de aceite esencial: 473.5, 236.75, 121.2, 60.6 y 30.3 mg l<sup>-1</sup>; en cada caja de Petri se adicionaron 15 ml de agar con aceite.

Los hongos *Colletotrichum* sp., y *Fusarium* sp. fueron tomados de la colección de hongos patógenos del laboratorio de fitopatología de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

### **Establecimiento del Cultivo de Ají Cayena (*Capsicum annuum*)**

#### **Semillero**

El semillero se estableció en cubetas de germinación, con sustrato canadiense, estas se colocaron a una profundidad de 1,5 cm.

#### **Trasplante**

El trasplante se realizó cuando las plántulas alcanzaron 5 cm de altura en promedio y presentaron 2 a 3 hojas después de 18 días después de la siembra; para esto, un día antes del trasplante se suspendió el riego para endurecer las plántulas, estas se colocaron en bolsas de 3 kg, con materia orgánica. Las bolsas debidamente marcadas se colocaron en el invernadero.

## **Elaboración de la suspensión de esporas**

A partir de cada hongo (*Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp.) de 168 horas de incubación se hizo la suspensión de esporas; a cada caja se le agregaron 10 ml de agua destilada estéril y se raspó la colonia con una varilla de vidrio acodada, de manera que todas las esporas posibles fueran colectadas. Los lavados resultantes de las cajas se recogieron en matraz volumétricos de 50 ml, que se mantuvieron en constante agitación. Posteriormente, las esporas se contaron en la cámara de Neubaver y a partir de ahí la suspensión se diluyó hasta ajustarla a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas por mililitro. Esta suspensión de esporas se hizo en el momento que se realizó el experimento, para evitar que las esporas ya estuviesen germinadas.

## **Ensayo Bajo Condiciones de Laboratorio**

### **Tratamientos**

Se evaluaron seis tratamientos, relacionados con la utilización de concentraciones de aceite esencial de *Lippia origanoides*:

T<sub>1</sub>= AE. 0.00 mg l<sup>-1</sup>

T<sub>2</sub>= AE. 473.5 mg l<sup>-1</sup>

T<sub>3</sub>= AE. 236.75 mg l<sup>-1</sup>

T<sub>4</sub>= AE. 121.2 mg l<sup>-1</sup>

T<sub>5</sub>= AE. 60.6 mg l<sup>-1</sup>

T<sub>6</sub>= AE. 30.3 mg l<sup>-1</sup>

Después de obtener la solución inicial del aceite esencial de *L. origanoides*, se diluyó de acuerdo al tratamiento, adicionando el PDA, homogenizando y vertiendo en las cajas de Petri.

## Diseño Experimental

Para cada hongo, se utilizó un diseño completamente al azar con seis tratamientos y cinco repeticiones.

## Variables de Respuesta

**Crecimiento:** La cual se define como el diámetro de crecimiento en centímetros de cada uno de los patógenos. Esta variable se midió durante aproximadamente nueve días.

**Eficiencia:** La cual se define en términos porcentuales como la inhibición en el crecimiento de *Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp., respecto al testigo y como consecuencia del efecto antifúngico del aceite esencial de *Lippia origanoides*. Matemáticamente se calculo de acuerdo a:

$$E(\%) = \frac{C_{\text{Testigo } j} - C_{\text{Tratamiento } i, j}}{C_{\text{Testigo } j}} \times 100$$

Donde:

E(%): Eficiencia del Tratamiento i en el control del crecimiento del patógeno en el día j; siendo i= 30.30, 60.60, 121.20, 236.75 y 473.50 mg.l<sup>-1</sup>, mientras que j= 1, 2, 3,..., 9 día.

C<sub>Tratamiento, i, j</sub>: Crecimiento del tratamiento i en el día j.

C<sub>Testigo j</sub>: Crecimiento del testigo en el día j.

### **Forma de Análisis**

Se realizó análisis de varianza; se utilizó la prueba múltiple de promedios de Tukey cuando se detectó efecto de tratamientos. Los datos tanto de crecimiento como Eficiencia para cada tratamiento en el tiempo, se ajustaron a los modelos de regresión logístico y exponencial respectivamente.

Para el procesamiento de los datos se utilizó el software SAS en su versión 9.2.

### **Ensayo Bajo Condiciones de Invernadero**

Después de obtener los extractos de los aceites esenciales, se evaluó en campo dando las condiciones adecuadas para el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

#### **Tratamientos**

Se evaluaron tres tratamientos, relacionados con la utilización de concentraciones de aceite esencial de *Lippia origanoides*:

T<sub>1</sub>= AE. 0.00 mg l<sup>-1</sup>

T<sub>2</sub>= AE. 473.5 mg l<sup>-1</sup>

T<sub>3</sub>= AE. 236.75 mg l<sup>-1</sup>

Las plantas de 25 días de sembradas, se sometieron a las diferentes concentraciones del aceite, luego a la suspensión de esporas y posteriormente fueron resembradas.

#### **Diseño Experimental**

Para cada hongo, se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones.

## Variables de Respuesta

**Mortalidad:** La cual se define en términos porcentuales como la cantidad de plantas muertas respecto a la muestra inicial que se sembró. Matemáticamente se calculo de acuerdo a:

$$M(\%) = \frac{P_{i,j}}{P} \times 100$$

Donde:

M(%): Porcentaje de Mortalidad de las plantas del Tratamiento i en el día j; siendo i= 0.00, 236.75 y 473.50 mg.l<sup>-1</sup>, mientras que j= 1, 2, 3, 5 y 5 día.

P<sub>i, j</sub>: Número de Plantas muertas, correspondientes al tratamiento i en el día j.

P: Numero de plantas sembradas al iniciar el experimento.

## Forma de Análisis

Se realizo análisis de varianza; se aplicó a la prueba múltiple de promedios de Tukey cuando se detecto efecto de tratamientos.

Para el procesamiento de los datos se utilizo el software SAS en su versión 9.2.

## 7.8 Procedimiento

Para el ensayo de laboratorio se sembró un disco de 9 mm de diámetro de micelio sobre las cajas de Petri, habiendo sacado un cultivo puro previamente seleccionado, se sembraron 5 cajas por repetición, estas fueron a una incubadora (Menmert) a una temperatura de 28°C se realizó un seguimiento al crecimiento micelial, hasta cuando el testigo negativo cubrió la caja Petri.

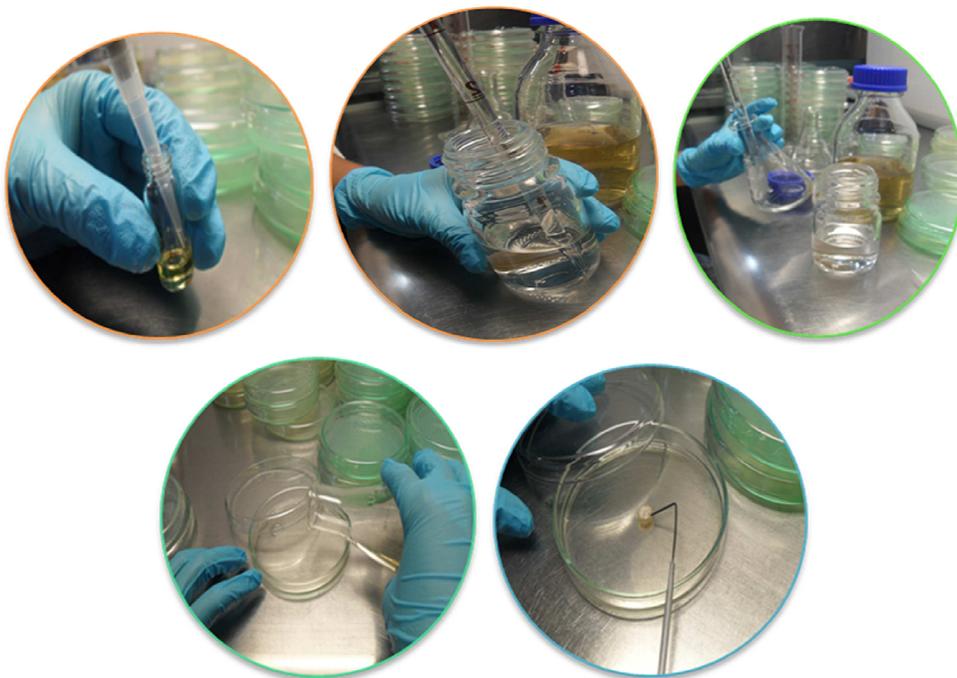


Figura 1. Ensayo *in vitro*

Para el ensayo de invernadero, las soluciones preparadas se colocaron en vasos de precipitado y se procedió a tratar las plantas. Las raíces de las plántulas se lavaron, posteriormente se sumergieron una por una en el vaso que contenía la concentración del aceite, se dejaron durante 2 minutos y se retiraron. Se dejaron secar durante 10 minutos y se sumergieron en la solución de esporas por 1 minuto, transcurrido el tiempo se procedió a sembrar. Se realizó seguimiento por 5 días y se evaluó el índice de mortalidad de plantas.

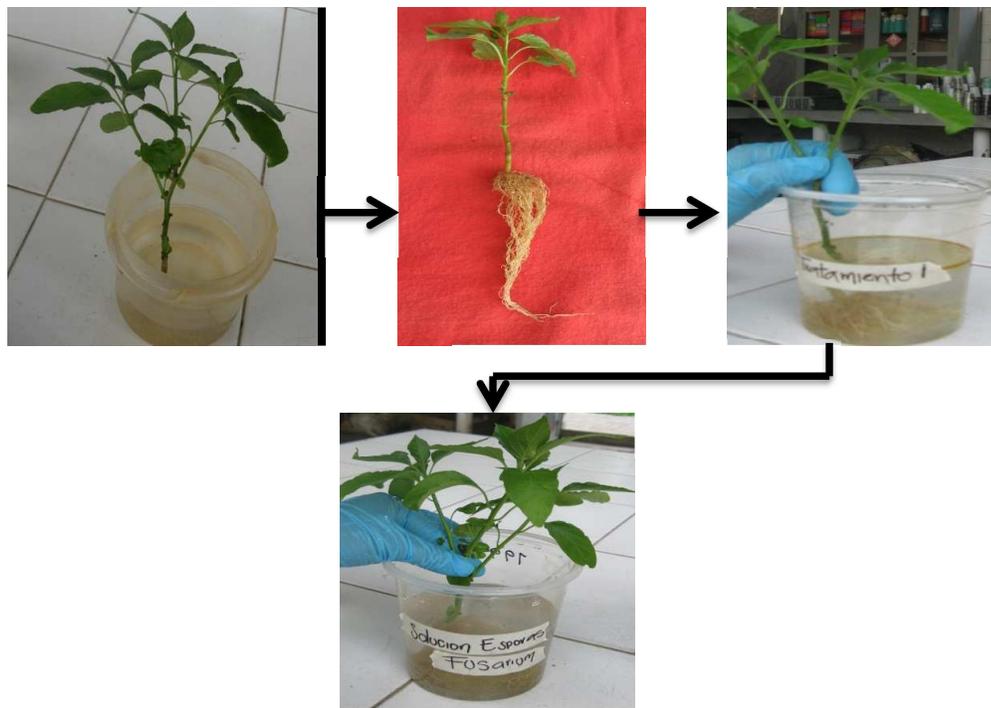


Figura 2. Bioensayo Invernadero.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto del Aceite Esencial de *Lippia organoides* Sobre el Crecimiento de *Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp.

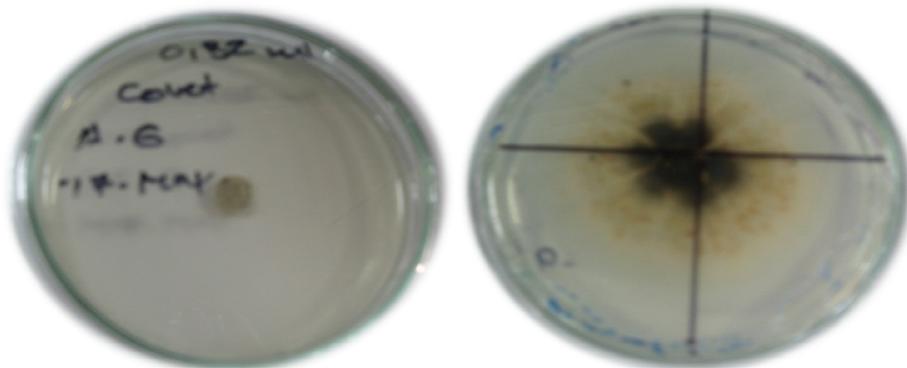


Figura 3. Ensayo *in vitro* *Colletotrichum* sp.

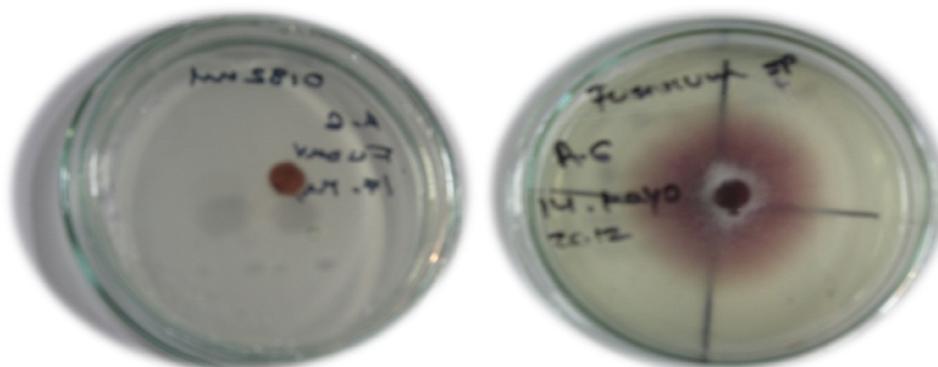


Figura 4. Ensayo *in vitro* *Fusarium* sp.

En la Tabla 1. Se consignan los resultados del análisis de varianza para la variable de respuesta crecimiento (cm), observándose que se detectan diferencias altamente significativas entre los promedios de las concentraciones tanto para *Fusarium sp.*, como *Colletotrichum sp.*

**Tabla 1.** Análisis de Varianza para la variable de respuesta crecimiento de *Fusarium sp.*, y *Colletotrichum* bajo condiciones de laboratorio.

F.V.	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	CM	Pr > F	CM	Pr > F
<b>Concentración</b>	1.2882	<.0001	0.6356	0.0002
<b>Tiempo</b>	4.7287	<.0001	4.3265	<.0001
<b>Concentración x Tiempo</b>	0.0113	1.000	0.0242	1.000
<b>Promedio</b>	<b>3.28</b>		<b>2.85</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>11.1</b>		<b>19.1</b>	

La prueba de promedios múltiple de Tukey (Tabla 2.), compara el crecimiento de cada tipo de hongo bajo diferentes concentraciones de aceite esencial de *Lippia origanoides*.

Se observa menor crecimiento de *Fusarium sp.*, en la concentración de 473.5 mg l<sup>-1</sup>, siendo de 1.930 cm y que difiere significativamente de los valores registrados en las concentraciones de 236.75, 121.2, 60.6, 30.3 y 0.0 mg l<sup>-1</sup>, cuyos promedios fueron en su orden de 2.736, 3.459, 3.629, 3.631 y 4.226 cm.

En lo relacionado a *Colletotrichum sp.*, donde parece evidenciarse una dinámica de crecimiento diferente a *Fusarium*, el valor promedio de crecimiento en el testigo fue de 3.310 cm (Tabla 2.). Este valor no difiere significativamente de lo observado en las concentraciones de 30,3, 60.6,

121.2, 236.75 mg l<sup>-1</sup> (3.163, 3.155 2.628 y 2.353 cm respectivamente), pero si respecto a la concentración de 473.5 mg l<sup>-1</sup> en el cual se registro un valor de 1.997 cm.

**Tabla 2.** Promedios de crecimiento de Tukey para las diferentes concentraciones de *L. origanoides* en relación con el crecimiento de *Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.*

Concentración	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	Promedio	Grupo de Tukey	Promedio	Grupo de Tukey
<b>0.00 mg/l</b>	4.23	a	3.31	a
<b>30.30 mg/l</b>	3.63	ab	3.16	a
<b>60.60 mg/l</b>	3.63	ab	3.15	a
<b>121.20 mg/l</b>	3.46	b	2.63	ab
<b>236.75 mg/l</b>	2.74	c	2.35	ab
<b>473.75 mg/l</b>	1.93	d	2.00	b

**Nota:** Dentro de la misma columna, promedios con igual letra no difieren a la probabilidad del 5%

El análisis de varianza evidencia el efecto del tiempo sobre el crecimiento tanto de *Fusarium sp.*, como de *Colletotrichum sp.*, el cual conforme a lo observado en la Tabla 3., parece estabilizarse al cabo del séptimo día, entorno a valores de 5.600 – 5.700 cm. El mismo análisis de varianza no detecta la dependencia de las concentraciones y el tiempo, sobre el desarrollo de los dos patógenos, lo cual haría suponer que el aceite esencial, actúa como un precursor que inhibe el crecimiento.

En la Figura 5. Se observan las curvas de crecimiento de *Fusarium sp.*, bajo diferentes concentraciones del aceite, anotando que los datos observados se ajustaron a un modelo de regresión logístico, cuyos parámetros se consignan en la Tabla 4. El parámetro hace referencia al crecimiento máximo esperado

de cada patógeno, mientras que  $T$  define el tiempo promedio donde el hongo detendría su desarrollo.

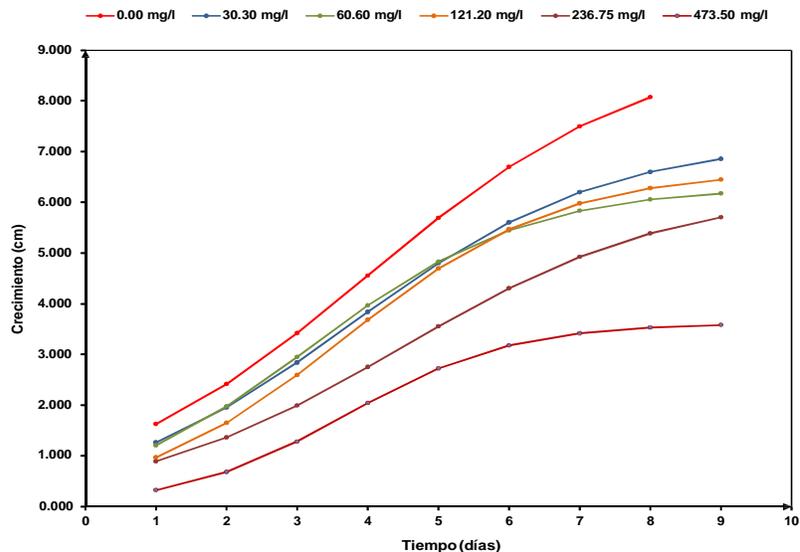
Para *Fusarium* sp., es evidente que el mayor desarrollo se observa en el testigo, donde se esperaría un crecimiento máximo 9.143 cm. En relación a las diferentes dosis del aceite esencial utilizado como posible inhibidor de crecimiento, el menor desarrollo se observa en la dosis de 473.5 mg l<sup>-1</sup>, donde el máximo esperado sería de 3.621 cm; para la dosis de 236.75, 121.2, 60.6 y 30.3 mg l<sup>-1</sup> se esperarían máximos de 6.253, 6.636, 6.315 y 7.226 respectivamente. En lo relacionado al tiempo en el cual se esperaría que el patógeno detuviera su crecimiento, los análisis registran entre 3.5-4.5 días.

**Tabla 3.** Crecimiento promedio de *Fusarium* y *Colletotrichum*, bajo condiciones de laboratorio y algunas concentraciones de aceite esencial de *Lippia* organoides.

Tiempo (días)	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	Promedio	Grupo de Tukey	Promedio	Grupo de Tukey
1	0.92	e	0.77	f
2	1.79	d	1.37	ef
3	2.57	cd	2.00	de
4	3.30	c	2.75	cd
5	4.47	b	3.66	bc
6	4.94	ab	4.63	ab
7	5.79	a	5.33	ab
8	5.78	a	5.07	ab
9	5.71	a	5.60	a

**Nota:** Dentro de la misma columna, promedios con igual letra no difieren a la probabilidad del 5%

Para *Colletotrichum*, los resultados del análisis de regresión demuestran mayor desarrollo en el testigo (Tabla 4. y Figura 6.) solamente a partir del quinto día, donde el crecimiento máximo esperado sería de 9.122 cm, infiriendo que su crecimiento se detuviese al cabo del quinto día. Para las diferentes dosis del aceite esencial, se esperarían crecimientos máximos de 4.337, 4.496, 4.403, 5.968 y 5.964 cm, en los casos de 473.5, 236.75., 121.2, 60.6 y 30.3 mg l<sup>-1</sup> respectivamente.



**Figura 5.** Interacción Concentración x Tiempo para la variable de respuesta crecimiento (cm) del aceite esencial de *Lippia origanoides* en el control de *Fusarium sp.*,

Como se observa en la Figura 5. La interacción de la concentración el tiempo, el aceite esencial de *Lippia origanoides*, pierden su actividad antifúngica al pasar los días es mas bajas concentraciones, para la concentración mas alta se ve una disminución en el crecimiento micelial (Alvarado A. M. 2009).

Además en otros estudios se ha observado que los medios de cultivo tienen un mayor contenido de agua, lo que favorece el efecto de los aceites, mientras que en los frutos el contenido de agua puede ser menor, lo que obstaculiza el efecto de los AE (Smith-Palmer et al., 2001).

La actividad antifúngica en estos trabajos estuvo fuertemente asociada con fenoles monoterpénicos, especialmente el timol, carvacrol y eugenol, (Bullerman et al., 1977; Hitoko et al., 1980; Karapinar, 1990). Velluti et al,

(2003) probaron aceites esenciales de *Lippia origanoides* sobre *Fusarium* sp. El cual inhibió el crecimiento del hongo.

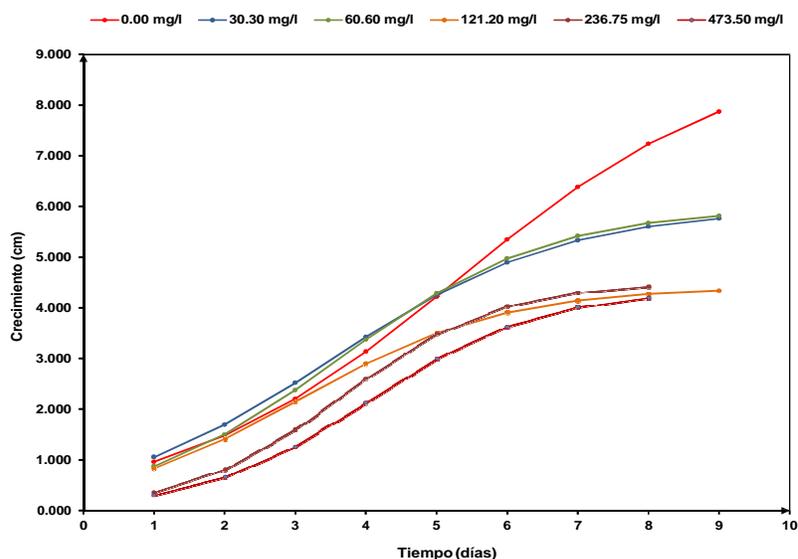
**Tabla 4.** Parámetros del Modelo de Regresión Logístico que simula el crecimiento de los hongos *Fusarium* y *Colletotrichum* bajo condiciones de laboratorio.

Hongo	Concentración	Parámetros			T (días)	R <sup>2</sup> (%)
		a	b	c		
Fusarium	0.00 mg/l	9.143	7.674	0.50783	4.0	98.9
Fusarium	30.30 mg/l	7.226	8.230	0.55816	3.8	99.0
Fusarium	60.60 mg/l	6.315	8.157	0.65603	3.2	98.9
Fusarium	121.20 mg/l	6.636	11.364	0.66278	3.7	99.1
Fusarium	236.75 mg/l	6.253	10.086	0.51747	4.5	97.6
Fusarium	473.50 mg/l	3.621	23.855	0.85715	3.7	93.6
Colletotrichum	0.00 mg/l	9.122	13.981	0.49778	5.3	99.3
Colletotrichum	30.30 mg/l	5.964	8.558	0.61163	3.5	98.1
Colletotrichum	60.60 mg/l	5.968	11.464	0.67552	3.6	96.9
Colletotrichum	121.20 mg/l	4.403	8.715	0.70471	3.1	91.5
Colletotrichum	236.75 mg/l	4.496	28.940	0.91958	3.7	91.9
Colletotrichum	473.50 mg/l	4.337	30.805	0.84492	4.1	95.1

De acuerdo con los resultados, en la tabla 4. En general se observó que a menor concentración (60.6 y 30.3 mg l<sup>-1</sup>) se presentó el mayor crecimiento micelial del hongo con respecto a las otras dos concentraciones, mientras que con 473.5 mg l<sup>-1</sup> hubo muy poco crecimiento micelial, y el 236.75 mg l<sup>-1</sup> se presentó un efecto intermedio respecto al testigo.

También se observó que conforme aumento la concentración de los Aceites esenciales, el efecto de inhibición sobre el crecimiento micelial es mayor, esto significa que se presentó un efecto dependiente de la concentración. Esto coincide con los resultados obtenidos por (Barrera- Necha et al., 2008) que utilizaron los AE de clavo y tomillo a concentraciones de 100, 150, 150 y 300 µg/ml sobre *Colletotrichum*, observando que conforme aumento la concentración de los AE y la inhibición en la producción de aflatoxinas por *A. flavus*, en nuez pecanera. (Alvarado A.M, 2009).

Existen diversos estudios con AE de diferentes especies vegetales, que se muestran que a mayores concentraciones hay mayor efecto sobre el crecimiento del hongo, como es el caso de *A. parasiticus* con el AE de tomillo, en donde este afecta el crecimiento del hongo y el desarrollo de esporas a una concentración de 250ppm (Rasooli y Owlia, 2005).



**Figura 6.** Interacción Concentración x Tiempo para la variable de respuesta crecimiento (cm) del aceite esencial de *Lippia origanoides* en el control de *Colletotrichum*.

Se considera que de manera natural los aceites esenciales juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de la planta en contra de microorganismos fitopatógenos, algunos tienen efecto antifúngico; reducen el crecimiento de las hifas, induce la lisis provocando la evacuación citoplasmática del hongo e involucra cambios en la composición de la célula, ruptura de la membrana plasmática, desorganización estructural de la mitocondria e interferencia de las reacciones enzimáticas de la membrana mitocondrial (Kishore y Pande, 2007). Además de que los aceites esenciales son compuestos naturales y por consecuencia son biodegradables, no son

residuales y no afectan al ambiente (Tripathi et al., 2004). De ahí la importancia del uso de los aceites para el control de enfermedades fúngicas.

Como se observa en la figura 6. El hongo *colletotrichum* tiene un menor crecimiento a través del tiempo en las concentraciones de 473.5, 236.75 y 121.2 mg l<sup>-1</sup>, para los demás tratamientos 60.6 y 30.3 mg l<sup>-1</sup>, presento un crecimiento intermedio en relación con el testigo.

#### **Eficiencia del Aceite Esencial de *Lippia organoides* sobre el Control de *Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.***

**Tabla 5.** Análisis de Varianza en relación a la eficiencia de las concentraciones de aceite esencial de *Lippia organoides* en el control de *Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.*

F.V.	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	CM	Pr > F	CM	Pr > F
<b>Concentración</b>	0.5287	<.0001	0.6608	<.0001
<b>Tiempo</b>	0.8734	<.0001	0.6248	<.0001
<b>Concentración x Tiempo</b>	0.0190	<.0001	0.0219	0.0008
<b>Promedio</b>	<b>55.5</b>		<b>65.8</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>8.6</b>		<b>9.7</b>	

En la Tabla 5. se observan los resultados del análisis de varianza para la variable de respuesta Eficiencia (%), la cual mide respecto al testigo, la reducción en el crecimiento tanto de *Fusarium* como de *Colletotrichum*, cuando se desarrolla en presencia de algunas concentraciones de aceite esencial de *Lippia organoides*. Se observan diferencias altamente significativas ( $Pr < 0.01$ ) entre las diferentes concentraciones utilizadas en el control de los dos patógenos.

El análisis de promedios múltiples de Tukey (Tabla 6.) indica que la mejor concentración de aceite esencial, utilizada en el control del crecimiento de *Fusarium* fue la de 473.5 mg l<sup>-1</sup>, reduciendo su crecimiento con respecto al testigo en 72.1%. El anterior valor difiere significativamente del promedio observado en la concentración de 236.75 mg l<sup>-1</sup>, cuyo porcentaje de eficiencia fue de 60.3%. Es de anotar que entre los promedios asociados con las bajas concentraciones de aceite esencial (121.2, 60.6 y 30.3 mg l<sup>-1</sup>) no se observaron diferencias estadísticas, aunque la reducción en el crecimiento es sensiblemente menor.

Lo anterior concuerda con lo expresado por Ospina (2008), el cual reporta actividad antifúngica del aceite esencial de *Lippia origanoides* en el control de otros tipos de hongos como *Sclerotium cepivorum*.

De acuerdo a la Tabla 6., en el control del crecimiento de *Colletotrichum*, las mayores reducciones se encontraron en las concentraciones de 473.5 y 236.75 mg l<sup>-1</sup>, observándose valores de 81.4% y 76.1% respectivamente, los cuales no difieren significativamente. Al igual que *Fusarium* sp., la menores reducciones en el crecimiento se observaron en las bajas concentraciones del aceite esencial, siendo estas de 63.1, 55.1 y 54.2% en las dosis de 121.2, 60.6 y 30.3 mg l<sup>-1</sup> respectivamente.

Avila *et al* (1996) reporta la actividad antifúngica de *Lippia origanoides* en el control de *Colletotrichum* sp.

**Tabla 6.** Promedios de Tukey para las diferentes concentraciones de aceites esenciales de *Lippia origanoides*.

Concentración	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	Promedio	Grupo de Tukey	Promedio	Grupo de Tukey
<b>30.30 mg/l</b>	72.1	a	81.4	a
<b>60.60 mg/l</b>	60.3	b	76.1	a
<b>121.20 mg/l</b>	49.1	c	63.1	b
<b>236.75 mg/l</b>	48.1	c	55.1	c
<b>473.75 mg/l</b>	46.9	c	54.2	c

**Nota:** Dentro de la misma columna, promedios con igual letra no difieren a la probabilidad del 5%

En relación al efecto del tiempo, el análisis de varianza (Tabla 5.) señala diferencias altamente significativas tanto para *Fusarium sp.*, como *Colletotrichum sp.*, lo cual podría indicar la pérdida de las propiedades inhibitorias del aceite esencial en el crecimiento de los dos patógenos. Lo anterior lo corrobora la Tabla 7. de promedios múltiples de Tukey, observándose inicialmente en *Fusarium sp.*, una reducción en el crecimiento de 83.3 %; sin embargo las propiedades inhibitorias comienzan a reducirse gradualmente a partir del segundo día (69.2%), hasta alcanzar valores que fluctúan alrededor del 30.0% al cabo del día ocho del experimento.

**Tabla 7.** Variación temporal de la eficiencia del aceite esencial de *Lippia origanoides* en el control de *Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.*

Tiempo (días)	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	Promedio	Grupo de Tukey	Promedio	Grupo de Tukey
1	83.3	a	90.5	a
2	69.2	b	84.0	ab
3	63.6	bc	75.2	bc
4	57.5	c	66.7	cd
5	41.6	cd	55.5	de
6	37.0	de	50.6	ef
7	27.4	ef	41.9	f
8	32.3	f	49.2	f
9	-	-	57.8	f

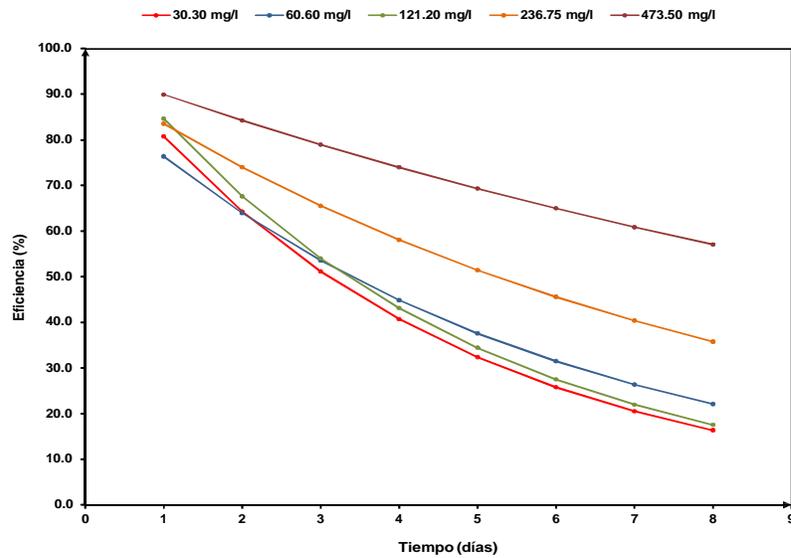
**Nota:** Dentro de la misma columna, promedios con igual letra no difieren a la probabilidad del 5%

Respecto a *Colletotrichum sp.*, (Tabla 7.) se observa en el primer día del experimento, una reducción en su crecimiento de 90.5%. Estos valores disminuyen progresivamente a partir del segundo día, hasta alcanzar porcentajes de reducción que se concentran en valores del orden del 60.0-40.0%. Los resultados anteriores permitirían inferir que las propiedades de aceite esencial de *Lippia origanoides* se pierden a través del tiempo.

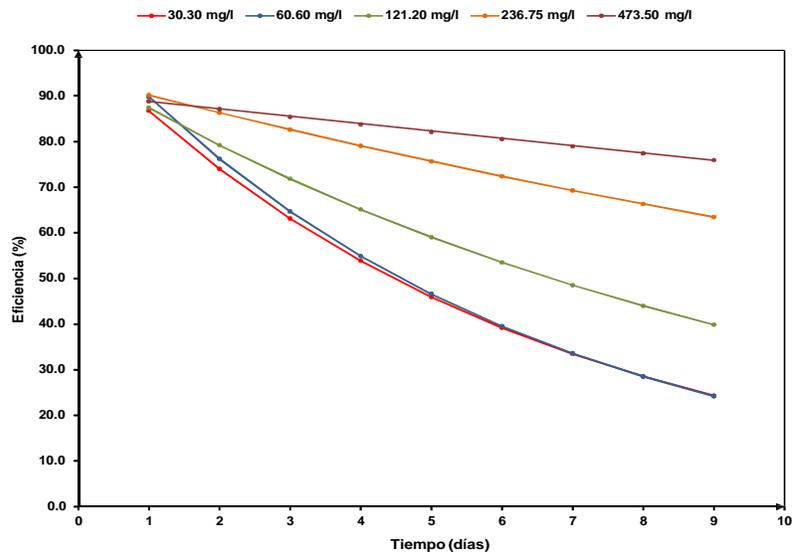
Para los dos patógenos, el análisis de varianza detecta como significativa la interacción Concentración x Tiempo. la dependencia de la variable de respuesta como significativa la interacción concentración por tiempo (tabla 1). En la Figuras 7 y 8. Se observan las curvas de reducción de crecimiento de *Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.*, bajo el efecto diferentes

concentraciones del aceite esencial de *Lippia origanoides*. Los datos observados se ajustaron a un modelo de regresión exponencial. Para *Fusarium*, inicialmente y durante toda la fase del experimento se observa una mayor reducción del crecimiento en la concentración de 473.5 mg l<sup>-1</sup>, la cual del 90.0 al 60.0%; las concentraciones de 236.75, 121.2, 60.6 y 30.3 mg l<sup>-1</sup>, promovieron reducciones inferiores en el crecimiento, llegándose finalmente a valores que fluctuaron entre 40.0 y 20.0%.

Para *Colletotrichum* sp. (Figura 8) en la concentraciones evaluadas, inicialmente se observa reducciones del crecimiento que varían entre 75.0 y 90.0%; sin embargo a partir del segundo día, las curvas de eficiencia muestran igual comportamiento en las concentraciones de 30.3, 60.6 y 121.2 mg l<sup>-1</sup>, alcanzando al cabo del día ocho, reducciones que fluctúan alrededor del 25.0%. En lo relacionado a las curvas de 236.75 y 473.5 mg l<sup>-1</sup>, se alcanzan al finalizar de el periodo de observación, reducciones entre 40.0 y 60% respectivamente.



**Figura 7.** Interacción Concentración x Tiempo para la variable de respuesta eficiencia (%) del aceite esencial de *Lippia organoides* en el control de *Fusarium sp.*



**Figura 8.** Interacción Concentración x Tiempo para la variable de respuesta eficiencia (%) del aceite esencial de *Lippia origanoides* en el control de *Colletotrichum* sp.

Muchas especies vegetales producen aceites esenciales los cuales juegan un papel importante en los mecanismos de defensa del hospedero contra fitopatógenos (Mihaliak *et al*, 1991). Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos tienen un efecto fungicida (Wilson *et al*, 1997; Godoi *et al*, 1997; Pitarokili *et al*, 1997; Meepagala *et al*, 2002). Son inocuos para el medio ambiente, para los consumidores y para el control de enfermedades postcosecha. La necesidad de reducir el uso de químicos sintéticos en la agricultura ha incrementado el interés por la posible aplicación de aceites esenciales para el control de fitopatógenos.

Los extractos vegetales de *Lippia origanoides* han mostrado un buen efecto en el control de *Botritis maydis*, *Rhizoctonia solani* (Rodríguez y Sanabria, 2005), *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Henríquez *et al.*, 2005), *Fusarium* sp. (Araujo *et al.*, 2008), demostrándose a posibilidad de uso de estas plantas para el control de otros patógenos.

**Efecto de las Concentraciones de aceite esencial de *Lippia organoides* en el Control de *Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp., bajo condiciones de Invernadero**



Figura 9. Efecto tratamiento *Lippia organoides* sobre el crecimiento de *Colletotrichum* sp.



Figura 10. Efecto tratamiento *Lippia origanoides* sobre el crecimiento de *Fusarium sp.*

En la Tabla 8. se consignan los resultados del análisis de varianza para la variable Porcentaje de Plantas muertas, observándose diferencias altamente significativas entre las concentraciones utilizadas para el aceite esencial de *Lippia origanoides*, como elemento de control tanto de *Fusarium sp.*, como de *Colletotrichum sp.*,

**Tabla 8.** Análisis de Varianza para la variable de respuesta Porcentaje de Plantas muertas.

F,V,	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	CM	Pr > F	CM	Pr > F
<b>Concentración</b>	0.0897	<,0001	0.0973	<,0001
<b>Tiempo</b>	0.2778	<,0001	0.2438	<,0001
<b>Concentración x Tiempo</b>	0.0064	<,0001	0.0085	0.0001
<b>Promedio</b>	<b>25.7</b>		<b>21.8</b>	
<b>CV (%)</b>	<b>3.70</b>		<b>4.72</b>	

De acuerdo a la Tabla 9 de promedios de Tukey, para *Fusarium* en la concentración de 473.5 mg l<sup>-1</sup>, se presentó el menor Porcentaje de Plantas muertas con 16.5%. Tanto en la menor concentración (236.75 mg l<sup>-1</sup>) como en el testigo se presentaron valores de 22.2 y 39.3% respectivamente. Para *Colletotrichum sp.*, se observaron porcentajes de mortandad de 11.8, 19.3 y 35.3% tanto para las concentraciones de 473.5 y 236.75 mg l<sup>-1</sup>, como para el testigo.

En relación al efecto del tiempo sobre el índice de mortandad, el análisis de varianza (Tabla 8.) detectó diferencias altamente significativas para los dos patógenos. De acuerdo a la Tabla 10 de promedios de Tukey, se observa

como a partir del segundo día plantas afectadas, siendo de 6.3 y 4.7% tanto para *Fusarium* sp., como *Colletotrichum* sp., en el mismo orden. Lo anterior podría estar ligado a la pérdida de las propiedades fúngicas de los aceites esenciales, efecto que ya se había observado bajo condiciones de laboratorio.

**Tabla 9.** Promedios de Tukey para las diferentes concentraciones de aceites esenciales de *Lippia origanoides* en relación con el porcentaje de plantas muertas.

Concentración	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	Promedio	Grupo de Tukey	Promedio	Grupo de Tukey
0.00 ml	39.3	a	35.3	a
236.75 mg/l	22.2	b	19.3	b
473.75 mg/l	16.5	c	11.8	c

**Nota:** Dentro de la misma columna, promedios con igual letra no difieren a la probabilidad del 5%

El análisis de varianza detectó (Tabla 8.) diferencias altamente significativas para la Interacción Concentración x Tiempo. En *Fusarium* sp., (Figura 11.), tanto para las concentraciones de 473.5 y 236.75 mg l<sup>-1</sup> como el Testigo, se observa en el tiempo el incremento en la mortandad de las plantas. En el caso del Testigo se alcanza al final del quinto día, 90.0% de mortandad; en los eventos de la mayor y menor concentración se observaron al final del experimento, porcentajes de plantas muertas de 60.0 y 50% respectivamente.

Respecto a *Colletotrichum* sp. (Figura 12.), el menor porcentaje de plantas muertas se observó en la concentración de 473.5 mg l<sup>-1</sup>, con un valor aproximado de 40% al cabo de cinco días; de igual manera y en mismo rango de tiempo, en la concentración de 236.75 mg l<sup>-1</sup>, se observó un 50% de

mortandad, mientras que en el testigo este valor se elevó a 85.0% de mortalidad.

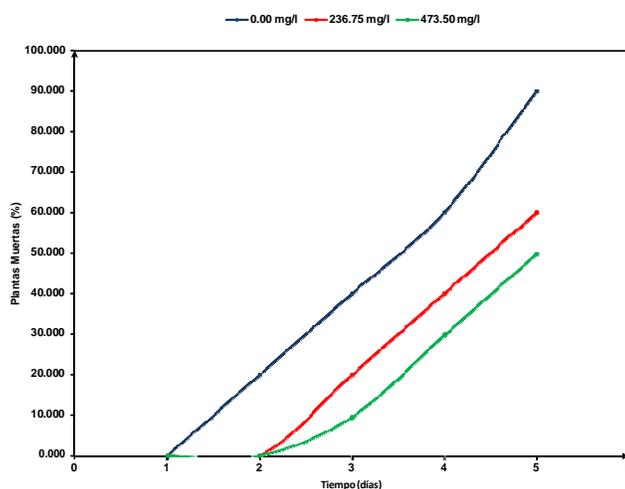
**Tabla 10.** Variación temporal de la eficiencia del aceite esencial de *Lippia origanoides* en el control de *Fusarium* y *Colletotrichum* en invernadero.

Tiempo (días)	<i>Fusarium sp</i>		<i>Colletotrichum sp</i>	
	Promedio	Grupo de Tukey	Promedio	Grupo de Tukey
5	65.9	a	60.9	a
4	42.8	b	35.9	b
3	22.7	c	15.7	c
2	6.3	d	4.7	d
1	0.0	e	0.0	d

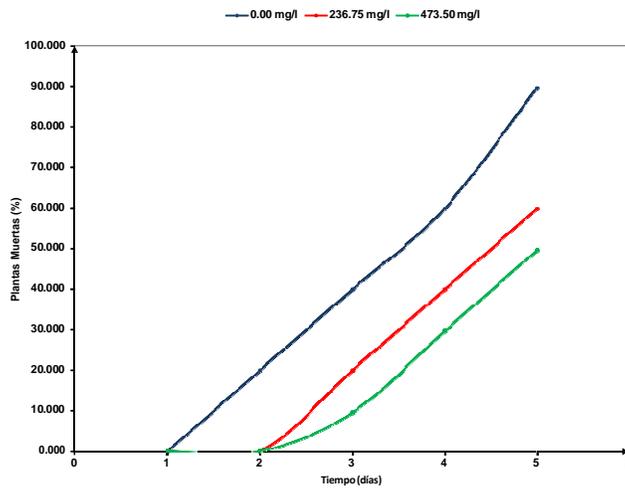
**Nota:** Dentro de la misma columna, promedios con igual letra no difieren a la probabilidad del 5%

Los resultados del ensayo *in vivo* corroboraron los obtenidos *in vitro*, demostrándose el potencial de *L. origanoides* para el control de la antracnosis. *Colletotrichum* puede penetrar el vegetal directamente o por heridas (O'Connell *et al.*, 2000), por lo que el presente ensayo se estableció con una infección forzada, posterior a la herida causada en el mango; bajo tales condiciones el AE de *L. origanoides* logró mantener la severidad de la antracnosis con un 37 % menos que en el control. En condiciones menos severas de infección y con un tratamiento preventivo, es posible que el nivel de protección con el extracto sea mayor (Penz & Sacc 2009).

Es importante recalcar que las condiciones in situ empleadas son completamente diferentes a las fase in vitro, pues las condiciones fueron mas controladas con respecto a la humedad, el contenido de nutrientes, la atmosfera y la temperatura; mientras que in situ las condiciones cambiaron, primordialmente por el modelo utilizado (jitomate) y la diferencia del ambiente. (Alvarado A. M. 2009)



**Figura 11.** Interacción Concentración x Tiempo para la variable de respuesta crecimiento (cm) del aceite esencial de *Lippia organoides* en el control de *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero.



**Figura 12.** Interacción Concentración x Tiempo para la variable de respuesta crecimiento (cm) del aceite esencial de *Lippia origanoides* en el control de *Colletotrichum* sp., bajo condiciones de invernadero.

## 9. Conclusiones

El aceite esencial de *Lippia origanoides* actuó como un inhibidor de crecimiento de los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp., y de *Colletotrichum* sp.

La concentración de aceite de *L. origanoides* 473.75 mg l<sup>-1</sup> inhibió el crecimiento de *Fusarium* sp., y *Colletotrichum* sp., in vitro y en condiciones de invernadero. Se observó una menor mortalidad de plantas, lo cual indica que esta concentración es la base para iniciar nuevos estudios en combinación con otros aceites esenciales que sean compatibles para llegar a un mejor control.

El aceite esencial de *Lippia origanoides* pierde sus propiedades inhibitorias al transcurrir tres días, debido posiblemente a su volatilización, se podría evaluar los activos del aceite para que el efecto perdure por más tiempo

En comparación con *Fusarium* sp., se observó una mayor susceptibilidad de *Colletotrichum* sp., a la acción de aceite esencial; lo anterior significa una mayor eficiencia del aceite en el control de *Colletotrichum* sp., alcanzando valores finales de 80% en la concentración de 473.5 mg l<sup>-1</sup>, y de 70% en la concentración 236.75 mg l<sup>-1</sup>. Para *Fusarium* sp., en las mismas concentraciones las eficiencias alcanzadas fueron de 60% y 40%.

En condiciones de invernadero se observó una menor mortalidad de plantas en la concentración de 473.5 mg l<sup>-1</sup>, siendo esta de 16.5% y 11.8% tanto para *Fusarium* sp., como para *Colletotrichum* sp., respectivamente.

## 10. Bibliografía

1. Alvarado A. 2009. Efecto anti fúngico In Vitro e In Situ del Quitosano y Aceites Esenciales sobre *Rizophus stolonifer*.
2. Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. (5th. ed.). Elsevier Academic Press. Burlington, USA.
3. Alexander S. A.; Waldenmaier C. 2001. Management of anthracnose in bell pepper. Eastern Shore Agricultural Research & Extension Center, VPI&SU, Painter.
4. Amukohe E 2008. Bioactive polar compounds from South African *Lippia* species. Thesis Magister Technologiae: Chemistry. Faculty of science Tshwane University of technology, Pretoria South Africa.
5. Andrade D. 2009. Contenido De Compuestos Fotoquímicos y su Relación Con la Capacidad Antioxidante de Extractos de Pimientos (*Capsicum annuum* L.) Cultivados en el Noroeste De México. Tesis de Maestría en Biociencias, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.
6. Arauz L; Grant F; Mora L; Saborio M; Vargas E.1999. Identificación de fuentes de resistencia a antracnosis (*Colletotrichum* sp.) en Chile picante (*Capsicum* spp.). Escuela de Fitotecnia; Costa Rica.
7. Arias E; Piñeros P. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Tesis de grado de microbiología industrial, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia 2008.
8. Barraza F. Quintero I. 2009. Densidad Poblacional y Plasticidad Fenotípica Del Ají Picante (*Capsicum annuum* L.) c.v. Cayena Long Slim. Rev. Intropica ISSN, Colombia.
9. Betancourt L., Ariza C., Díaz J., Afanador G. 2012. Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de *Lippia organoides kunth* en pollos de engorde. Revista MVZ Córdoba, ISSN-e 1909-0544, Vol. 17, Nº. 2, págs. 3033-3040.

10. Betancourt L, Zapata B, Baena A, Bueno J, Ruiz C 2011. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. Universidad de Antioquia. Medellín- Colombia.
11. Bittara F, Rodríguez D, Sanabria M, Monroy J. 2009. Evaluación De Fungicidas Y Productos Vegetales en el Combate De la Sarna Polvorienta De La Papa. Barquisimeto, Venezuela.
12. Bittara F, Rodríguez D, Sanabria M, Monroy J, Rodríguez J. 2009, VOL. 34 Nº 4 Evaluación De Fungicidas Y Productos Vegetales En el Combate De la Sarna Polvorienta De La Papa.
13. Bolívar K, Sanabria M, Rodríguez D. 2009. Potential fungicidal effect of plant extracts on in vitro development of *Colletotrichum gloeosporioides* and on anthracnose of mango. Escuela de Ciencias. Cumaná, estado Sucre, Venezuela.
14. Bolívar K, Sanabria M, Rodríguez D, 2009. Post harvest quality of mango fruits (*Mangifera indica* L.) inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides* and treated with plant extracts. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Cabudare, estado Lara, Venezuela.
15. Castañón G. Latournerie L., Leshner J., De la Cruz E., Mendoza M. 2010. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES PARA CARACTERIZAR MORFOLOGICAMENTE COLECTAS DE CHILE (*Capsicum* spp.) EN TABASCO, MÉXICO.
16. Castellanos C. Barrera J. Hernández M. Carrillo M. Rodríguez L. Martínez O. 2009. Efecto de la densidad de plantación sobre crecimiento, producción y calidad en cinco accesiones de ají (*Capsicum* spp.) cultivadas en la Amazonia occidental colombiana. Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas - Vol. 3 - No. 1 - pp. 95-109.
17. Celis C, Escobar P, Isaza J, Stashenko E, 2007. Estudio comparativo de la composición y actividad Biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia Alba*, *Lippia origanoides* y *Phyla Dulcis*, Especies de la familia

Verbenácea. . Universidad tecnológica de Pereira, Pereira- Colombia.

18. Celis C. 2007. Estudio Comparativo De la Composición Y Actividad Biológica De los Aceites Esenciales Extraídos De *Lippia alba*, *Lippia Origanoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, Especies De la Familia *Verbenaceae*. Tesis de grado para optar al título de Química. Universidad Industrial De Santander, Bucaramanga- Colombia.
19. Comunicación personal con SR: Hugo Restrepo & CIA 2011.
20. Dos Santos, F. J.; Lopes, A. D.; Cito, G. L.; De Oliveira, E. H.; De Lima, S. G.; Reis, F. (2004). Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H. B. K. *Journal of Essential Oil Research* 16 (5), 504-506.
21. Escobar P, Leal S, Herrera L, Martínez J, Stashenko E, 2010. Chemical Composition and Antiprotozoal Activities of Colombian *Lippia* spp. Essential oils and Their Major Components, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
22. Estrada S., Edgar Iván. 2003. Mejoramiento Genético y Producción de Semillas de Hortalizas para Colombia. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 240p.
23. Estrada, E. I.; Baena, D.; Ramírez, J. A.; Muñoz, E.; Pereira, M. A. 2009. Mejoramiento de la Productividad del Ají Cultivares Cayena, Tabasco y Habanero, mediante la Estabilización Genética y Fenotípica de un núcleo de Semilla Fundamental. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
24. FAO, 2009. Producción mundial de chiles, pim. pic., pim. (Verde). Fecha de acceso Julio de 2009, <http://www.faostaUao.org/>
25. Flor C; Ruiz W; Tobar J, Gallo J; Rengifo E. 2007. Evaluación Agronómica De Ocho Variedades De Ají En la Vereda Villanueva Municipio De Popayán. Colombia.

26. Furtado A. S. Mello; A. Zamboni; I. Bedendo. 2004. DEVELOPMENT OF *Colletotrichum gloeosporioides* ISOLATED FROM GREEN PEPPER IN DIFFERENT CULTURE MEDIA, TEMPERATURES, AND LIGHT REGIMES; Brazil
27. García M. A; Muñoz C.G; 2010. Mejoramiento genético de pimentón y ají para resistencia a virus. Entidad representante: Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.
28. Gonzales E; Yañez M; Santiago V; Montero A. 2004. Biodiversidad Fungosa en la marchitez del Chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo. México.
29. Henao J, Muñoz L, Ríos E, Padilla L, 2009. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* H.B.K. Cultivada en el departamento del Quindío, Universidad del Quindío, Armenia Quindío Colombia.
30. Henao J, Muñoz L, Padilla L, Ríos E; 2010. Extraction and Characterization of the Essential Oil of *Lippia origanoides* H.B.K. "Oregano De Monte" Cultivated AT Quindío and Evaluation of Antimicrobial Activity. Universidad Del Quindío. Armenia, Quindío Colombia.
31. Hoon Kim S, J. Bok Yoon, J. Wahng Do, H. Park. 2003. Resistance to Anthracnose Caused by *Colletotrichum acutatum* in Chili Pepper (*Capsicum annum* L.). Korea.
32. Hurtado I. 2010. BUSQUEDA DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* Leonian EN GERMOPLASMA DE *Capsicum* spp. Tesis de Maestría en Ciencias con Énfasis en Recursos Fitogenéticos. Universidad Nacional. Palmira- Colombia.
33. Kraikruan W, S. Sangchote y S. Sukprakarn. 2008. Effect of Capsaicin on Germination of *Colletotrichum capsici* Conidia.
34. López G. 2003. Chilli: la especia del nuevo mundo. Ciencias, enero –

marzo, numero 069. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 66-75.

35. Manual técnico no. 2. Sevilla - zona bananera, 2005)
36. Melgarejo L. M; Hernández M; Barrera J. 2004. Caracterización y usos potenciales del banco de germoplasma de ají amazónico. Bogotá, Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-Sinchi, Universidad Nacional de Colombia.
37. Méndez R, Serrano J\*, Chataing B\*, Jiménez D\*2007. Estudio Comparativo de la Actividad Biológica del Aceite Esencial *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March y el Aceite Esencial *Lippia organoides* Hbk Sobre Tres Especies de *Nocardia* sp. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias -Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.
38. Meneses R. 2007. Actividad De Extractos Naturales Sobre La Replicación In Vitro Del Virus De la Fiebre Amarilla. Tesis de Grado como requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas. Universidad Industrial De Santander. Bucaramanga-Colombia.
39. Muñoz A., Kouznetsov V., Stashenko E. 2009. Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, *trans*-Anetol o Estragol. Universidad Industrial de Santander.
40. Muñoz A, Kouznetsov V, Stashenko E; Vol. 41, No 3 (2009). Composición y capacidad antioxidante *in-vitro* de aceites esenciales ricos en Timol, Carvacrol, *trans*-Anetol o Estragol; Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga – Colombia.
41. Nuez, F.; GIL, R.; Costa, J. 1996. El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes. Madrid: Mundiprensa, 607 p.
42. Núñez M, 2011. Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta. Tesis de Magister en Ciencias- Microbiología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá,

Colombia.

43. Ochoa L. Lundy M. 2002. Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura Y La Alimentación Oficina Regional Para América Latina y el Caribe el Caso de Producción de Pasta de Ají para Exportación en el Valle del Cauca Colombia. Santiago de Chile.
44. Oliveira D, Gilda G, Bizzo H, 2006. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil.
45. Oliveira D., Leitão G., Bizzo H., Lopes D., Alviano D., Alviano C., Leitão S. 2007. Químicas y antimicrobianas análisis de aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK. Química de los Alimentos. Volumen 101, Número 1, páginas 236-240.
46. Olivero J., Caballero K., Jaramillo B. 2009. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. . Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Cartagena, Colombia.
47. Ospina D., Álvarez V, Torres H., Sánchez M., Bonilla Carmen R., Bonilla C; 2010. Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de aceites esenciales de *Lippia origanoides* H.B.K. sobre el desarrollo micelial y la formación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
48. Ospina Salazar Daniel. Determinación *in vitro* de la actividad inhibitoria sobre *sclerotium cepivorum* berk de extractos de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* H.B.K. Palmira 2008. Trabajo de grado (ingeniero agrónomo) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias agropecuarias.
49. Palacios S. 2007. CARACTERIZACIÓN MORFOLOGICA DE ACCESIONES DE *Capsicum* spp. Tesis de Maestría en Ciencias con Énfasis en Recursos Fitogenéticos. Universidad Nacional. Palmira-Colombia.

50. Pardey C. García M. Vallejo F. 2009. Evaluación agronómica de accesiones de *Capsicum* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
51. Pardey C. 2008. CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ACCESIONES DE *Capsicum* DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE PALMIRA Y DETERMINACION DEL MODO DE HERENCIA DE LA RESISTENCIA A POTYVIRUS (PepDMV). Tesis de Doctorado en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional. Palmira-Colombia.
52. Pardo C, Víctor Manuel 1995. Hongos Fitopatógenos De Colombia. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.
53. Pakdeeveraporn P; S Wasee; P Taylor y O. Mongkolporn. 2004. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. Verlag, Berlin.
54. Potes J. (2006). Extracción, Caracterización y Evaluación del Potencial Agroindustrial del Aceite Esencial de Dos Quimiotipos de *Lippia organoides* en Condiciones del Valle del Cauca. Trabajo de grado (Ingeniera Agroindustrial), Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
55. Ramírez L, Isaza J, Veloza L, Stashenko E, 2009. Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia organoides* de diferentes orígenes de Colombia, Santander, Colombia.
56. Ramón V; Rodas F. 2007. El control orgánico de plagas y enfermedades de los cultivos y la fertilización natural del suelo. Venezuela.
57. Rodríguez Pacheco Alejandra I. Efecto Del Aceite Esencial De Cinco Especies Nativas Chilenas Sobre el Crecimiento de *Botrytis cinérea* Y *Penicillium expansum*. Chillán-Chile 2010. Trabajo de grado (ingeniero Agrónomo) Universidad De Concepción. Facultad De Agronomía.

58. Rodríguez E., Bolaños M., Menjivar J. 2010. Efecto de la fertilización en la nutrición y rendimiento de ají (*Capsicum* spp.) en el Valle del Cauca, Colombia. Acta Agron. vol.59 no.1 Palmira.
59. Rúgeles L. Ávila J. Morales A. Huertas A. Guaitero B. Bonilla C. 2010. Agenda Prospectiva de Investigación Y Desarrollo Tecnológico Para la Cadena de Hortalizas en Colombia: Salsa de Ají. Bogotá Colombia.
60. Ruiz C. 2008. Estudio De Los Metabolitos Secundarios Volátiles De *Lippia organoides* H.B.K., En Tres Estados Fenológicos. Tesis para obtener el título de Químico. Universidad Industrial De Santander. Bucaramanga- Colombia.
61. Sanabria M, Rodríguez D, Rodríguez J 2006. Inhibición De Hongos Fitopatógenos Con Extractos DE *Phyllanthus niruri* L. y *Lippia organoides* (H.B.K.). Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto, Venezuela.
62. Santos P. Estrategias para el control de *Phytophthora capsici* Leo y *Fusarium solani* en el cultivo de chile (*Capsicum annum* L). Tesis de maestría en el área de fitopatología. Escuela de posgraduados. Montecillo, Texcoco, EDO de México 2010.
63. Shivashankar S; C Thimmareddy y K Roy. 2010. Polygaracturonase inhibitor protein from fruits and anthracnose resistant and susceptible varieties of Chilli (*Capsicum annum* L). University of Agricultural Sciences, Bangalore, India.
64. Sivira A., Sanabria M., Valera N., Vásquez C. 2010. Toxicity of Ethanolic Extracts from *Lippia organoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). Barquisimeto Venezuela.
65. Soto J. Lucero H. 2004. Oidiopsis Taurica Nuevo Patógeno De Pimiento (*Capsicum annum* L.) Y Ají (*Capsicum frutescens* L.) en Mendoza (Argentina). Rev. FCA Tomo XXXVI. Nº1. 87-100.
66. TOTO H. I. A. 1999. Enfermedad del Ají (*Capsicum annum* L.),

- variedad cayenne, en la zona cafetera central. N° 29. Fitopatología. Universidad de Caldas, A. A. 275. Manizales. Colombia.
67. Umesh. P; Sanjay R. 2008. Epitypification and phylogeny of *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, Tailandia.
68. Vallejo, FA Y Estrada, E.1. 2002. Mejoramiento Genético de Plantas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 402 p.
69. Vallejo, FA Y Estrada, E.1. 2004. Producción de Hortalizas de Clima Cálido. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 250 p.
70. Vargas J, Rodríguez D, Sanabria M. 2009. Efecto de tres extractos vegetales sobre la Sigatoka negra del plátano (*Musa AAB* cv. Hartón). Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, estado Lara, Venezuela.
71. Vega N, 2011. Estructura Poblacional de *Lippia organoides* H.B.K. en el Cañón del Río Chicamocha (Boyacá & Santander, COL). Tesis de Magister en Ciencias Agrarias; Universidad Nacional de Colombia; Bogotá, Colombia.
72. Vicuña G., Stashenko E., Fuentes J. 2010. La composición química de la *Lippia organoides* aceites esenciales y su antigenotoxicidad contra daño en el DNA inducida por bleomicina Volumen 81, Número 5 , páginas 343-349.
73. Zapata B., Durán C., Stashenko E., Correa J., Betancur L. 2010. Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. Universidad Industrial de Santander.
74. Zapata M., Durán C., Stashenko E., Correa J., Betancur L. 2009. Actividad citotóxica de aceites esenciales de *Lippia organoides* H.B.K. y componentes mayoritarios. Salud UIS; 41(3): 215-222.
75. Zapata B, Durán C, Stashenko E, 2009. Actividad antimicótica, citotoxicidad y composición de aceites esenciales de plantas de la familia *Labiatae*. Universidad de Antioquia, Medellín- Colombia.