

Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.*, agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.)

In vitro effect of essential oils of three *Lippia* species on *Moniliophthora roreri* (Cif. and Par.) Evans *et al.*, causative agent of moniliasis of cocoa (*Theobroma cacao* L.)

Betty Stefany Lozada¹, Laura Viviana Herrera¹, Janeth Aidé Perea², Elena Stashenko³, y Patricia Escobar^{1*}

¹Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP), Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Universidad Industrial de Santander. ²Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA), Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander. ³Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL-CENIVAM, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

*Autor para correspondencia: pescobarwww@gmail.com

Rec.: 08.03.11 Acept.: 05.06.12

Resumen

Se evaluó el efecto antifúngico in vitro de cinco aceites esenciales (AEs) (AE1, AE2, AE3, AE4 y AE5) extraídos de *Lippia origanoides*, *L. citriodora* y *L. alba* sobre aislados de monilia (*Moniliophthora roreri*) obtenidos de frutos de cacao infectados provenientes de San Vicente de Chucurí, Santander, Colombia. Las plantas de *Lippia* fueron colectadas en cinco localidades colombianas. Los aislados de monilia (M1, M2, M3, M4 y M5) fueron caracterizados por su morfología, germinación y crecimiento en medios de cultivo. La actividad antifúngica de diferentes concentraciones de los AEs fue evaluada contra el aislado M2 y la cepa de *M. roreri* (ATCC 64239), para determinar su efecto sobre la germinación y la inhibición del crecimiento micelial. Los AEs estudiados inhibieron 100% de la germinación y del crecimiento micelial cuando fueron utilizados en concentraciones de 800 - 1000 µg/ml. Concentraciones de 200 µg/ml también mostraron efecto sobre los aislamientos fúngicos, siendo los AEs obtenidos de *L. origanoides* (AE2 y AE3) los más activos. Estos estaban compuestos principalmente por timol, *p*-cimeno, γ -terpineno, acetato de timilo, carvacrol, β -mirceno, *trans*- β -cariofileno. Diferencias significativas ($P < 0.05$) sobre la susceptibilidad se observaron entre las dos cepas fúngicas estudiadas, siendo en general más susceptible el aislado M2 que la cepa ATCC. Los AEs de *L. origanoides* son candidatos para ser usados como posibles biofungicidas en el control de la moniliasis. Son necesarios estudios futuros orientados a determinar la actividad in vivo antifúngica de estos AEs y sus principales componentes.

Palabras clave: Control cultural, fungicidas, *Lippia* spp., monilia, *Moniliophthora roreri*, plantas aromáticas, plantas plaguicidas, *Theobroma cacao*.

Abstract

The in vitro antifungal effect of five essential oils (EOs) (EO1, EO2, EO3, EO4 and EO5) extracted from *Lippia origanoides*, *L. citriodora* and *L. alba* on isolates of Monilia (*Moniliophthora roreri*) was evaluated. *Lippia* plants were collected at five locations in Colombia, and monilia isolates were obtained from infected cocoa fruits collected in San Vicente de Chucurí, Santander, Colombia. The fungi strains (M1, M2, M3, M4 and M5) were characterized by morphology, germination and growth in culture media. Antifungal activity of different concentrations of EOs was evaluated against the M2 and the isolated

strain of *M. roreri* (ATCC 64239) determining their effect on germination and mycelial growth inhibition. The five essential oils studied inhibited 100% germination and micelial growth when they were used at concentrations from 800 to 1000 µg/ml. Concentrations of 200 µg/ml also showed an effect on fungal isolates, being the EOs obtained from *L. origanoides* (EO2 and EO3) the most active. These were mainly composed of thymol, *p*-cymene, γ -terpinene, timilo acetate, carvacrol, β -myrcene, *trans*- β -caryophyllene. Significant differences ($P < 0.05$) on susceptibility were observed between the two fungal strains studied, being generally more susceptible the isolated M2 that the ATCC strain. The EOs of *L. origanoides* are candidates for use as biofungicides possible to control the moniliasis. Future studies oriented to determinate the in vivo antifungal activity of these EOs and its major components are required.

Key words: Antifungic agents, aromatic plants, cultural control, frosty pod rot, *Lippia* spp., *Moniliophthora roreri*, pesticide plants, *Theobroma cacao*.

Introducción

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es un árbol tropical del cual se obtienen las semillas productoras de chocolate y sus derivados, que constituye el tercer producto agrícola más importante en los países tropicales, después del té y el café. La producción mundial anual de cacao es aproximadamente de 3,700,000 toneladas, 68% de la cual proviene del continente africano, seguido por Indonesia (12%), Latinoamérica (8%) y otros países tropicales (10%) (Prabhakaran, 2010; Hebbar, 2007).

La calidad y la producción de los cultivos de cacao se encuentran limitadas principalmente por problemas fitosanitarios, que generan pérdidas hasta del 100% de las cosechas (Hebbar, 2007). Entre las enfermedades más importantes se encuentran las infecciones por hongos fitopatógenos como la 'escoba de bruja' causada por *Moniliophthora perniciosa* (= *Crinipellis perniciosa*), la moniliasis o pudrición acuosa producida por *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans *et al.* (1978) y la pudrición negra, causada por varias especies de *Phytophthora* (Hebbar, 2007).

En Colombia, la moniliasis, una enfermedad dos veces más destructiva que la pudrición negra y más difícil de controlar que la escoba de bruja, se encuentra ampliamente distribuida y ocasiona pérdidas superiores al 90% de la producción (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). La patogenicidad de la enfermedad ha sido atribuida a la capacidad de penetración y multiplicación del hongo en el parénquima cortical de la planta, lo que causa necrosis de los tejidos. Además, el inóculo de frutos infectados es muy abundante y puede

conservar su alta capacidad infectiva hasta por nueve meses (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007). Las esporas del hongo infectan exclusivamente los frutos y, según la edad y las condiciones ambientales, producen síntomas como maduración prematura, hipertrofias, deformaciones, puntos de color verde con zonas amarillentas de maduración, manchas de color marrón cubiertas con un micelio blanquecino, marchitez y secamiento completo de los frutos (Evans, 2002; Phillips-Mora y Wilkinson, 2007).

Las medidas de control están orientadas principalmente a evitar la diseminación de la enfermedad y a la implementación de buenas prácticas de cultivo como podas, drenajes, remoción de frutos enfermos, entre otros. Debido a que estas prácticas culturales son costosas, se buscan alternativas como la utilización de biocontroladores, clones de cacao resistentes a la infección y productos químicos elaborados con cobre, recomendados como complemento en plantaciones con alta productividad.

Los productos naturales derivados de plantas, entre ellos los aceites esenciales (AE), constituyen una alternativa de control de las enfermedades ocasionadas por fitopatógenos. Estos productos son mezclas complejas de compuestos orgánicos presentes en diferentes concentraciones (Stashenko *et al.*, 2010). Los AEs derivados de plantas aromáticas pertenecientes a diferentes familias, especialmente a la familia Lamiaceae, o sus componentes principales han mostrado una buena actividad contra algunas especies de hongos fitopatógenos (Muller-Riebau *et al.*,

1995; Zambonelli *et al.*, 1996; Pitarokili *et al.*, 2003; Kordali *et al.*, 2008).

El género *Lippia* está constituido por plantas aromáticas utilizadas tradicionalmente para el control de enfermedades gastrointestinales y respiratorias (Pascual *et al.*, 2001). Se encuentran ampliamente distribuidas en el territorio colombiano y las especies más frecuentes son *L. origanoides* H.B.K., *L. citriodora* (Ort.) H.B.K. y *L. alba* (Mill.) N.E. Brown (Mesa-Arango *et al.*, 2009; Stashenko *et al.*, 2010). Las plantas de *L. alba* se clasifican en diferentes quimiotipos (I-VII) de acuerdo con las variaciones intraespecíficas en los patrones de composición (Hennebelle *et al.*, 2006). Los AEs de este género muestran un amplio espectro de actividades biológicas contra bacterias, hongos, parásitos, virus e insectos (Escobar *et al.*, 2010; Meneses *et al.*, 2009; Mesa-Arango *et al.*, 2009; Olivero *et al.*, 2009). Algunas especies de *Lippia* han revelado actividad contra hongos fitopatógenos (Deka *et al.*, 2010; Linde *et al.*, 2010; Regnier *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad de los AE de *L. origanoides*, *L. citriodora* y *L. alba* sobre aislados de *Moniliophthora roreri* obtenidos de frutos de cacao recolectados en el departamento de Santander, Colombia.

Materiales y métodos

Recolección, procesamiento y caracterización de frutos

En enero y mayo de 2009 se recolectaron frutos de cacao en cuatro fincas productoras de

la zona rural del municipio de San Vicente de Chucurí, Santander, localizadas entre 720 y 1200 m.s.n.m. (Cuadro 1). De cada planta se seleccionó aleatoriamente un fruto enfermo con síntomas tempranos de la enfermedad como gibas o jorobas y puntos o manchas pardo-oscuras en la corteza.

Después de lavar los frutos recolectados, se tomaron fragmentos de la corteza que fueron sembrados en agar papa dextrosa (PDA, Merck) y agar extracto de malta (MEA, Merk) a 25 °C hasta observar crecimiento (Saldarriaga y Pineda, 2001). Las colonias fueron identificadas por sus características macroscópicas y microscópicas y las compatibles se replicaron en PDA hasta obtener cultivos puros. Para la clasificación se siguieron los criterios descritos en el manual de Barnett y Hunter (1972).

En total se obtuvieron cinco aislados de *Moniliophthora roreri* (M1, M2, M3, M4 y M5 -Cuadro 1) que fueron caracterizados por diámetro, coloración y textura de las colonias, tipo y tamaño, crecimiento en PDA y MEA y producción de esporas (Cuadro 1). El aislado M2 presentó la mayor tasa de crecimiento y porcentaje de germinación, características indispensables para la realización de los ensayos de actividad antifúngica propuestos; por tal motivo éste fue el único aislado fúngico utilizado. En el estudio también se usó una cepa referenciada de *M. roreri* obtenida del ATCC 64239 que se denomina en este texto cepa ATCC. Aunque no hay información de la susceptibilidad de esta cepa a antifúngicos, se consideró conveniente utilizarla ya que, a diferencia del aislado M2, está caracterizada

Cuadro 1. Origen de aislados y características de hongos a partir de frutos de cacao con síntomas de moniliasis.

Aislado	Origen			Germinación (% ± DE)*	Diámetro de colonias (cm ± DE)**	
	Clon de origen	Finca	Altura (m.s.n.m.)		MEA	PDA
M1	Híbrido	Chimita	900	10.19±1.55	4.2±0.21	3.7±0.00
M2	ICS 60	Macondo	1200	15.65±0.16	5.0±0.00	4.1±0.00
M3	ICS 60	Macondo	1200	8.87±0.95	5.0±0.00	4.5±0.07
M4	CCM51	Porvenir	900	8.90±0.28	5.0±0.00	4.5±0.07
M5	CCM51	Porvenir	900	8.25±1.20	5.0±0.00	4.2±0.07

*: 48 h pos-inoculación; **: 21 días pos-inoculación, DE: Desviación estándar, MEA: Agar extracto de malta, PDA: Agar-papa-dextrosa.

como *M. roreri*, la especie de *Moniliophthora* involucrada en la moniliasis de cacao (Phillips-Mora y Wilkinson, 2007).

Aceites esenciales utilizados

En el estudio se utilizaron cinco AEs (AE1, AE2, AE3, AE4 y AE5) obtenidos de plantas de *Lippia* distribuidas en diferentes lugares de Colombia (Cuadro 2). La identificación taxonómica de las plantas se hizo en el Herbario Nacional de Colombia. Las plantas fueron clasificadas por el doctor J. L. Fernández y los pliegos-testigo de cada planta fueron depositados en el mismo Herbario (Cuadro 2).

Los AEs se obtuvieron a partir de 300 g de hojas y tallos del material cosechado, por hidrodestilación asistida y radiación con microondas (MWHM). La identificación de los componentes presentes en ellos se llevó a cabo por cromatografía de gases mediante acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) empleando un cromatógrafo Agilent Techno-

gies 6890 Plus (HP, Palo Alto, California, USA) acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies MSD 5973 (Stashenko *et al.*, 2010). Como control positivo se utilizó la anfotericina B (AmB, Sigma-Aldrich).

Se prepararon soluciones stock de los AEs y la AmB en dimetilsulfóxido (DMSO) y soluciones de trabajo en solución salina pH 7.4. La concentración final de DMSO en la solución stock fue menor que 0.05%. Se prepararon diluciones seriadas de los AEs en el medio de cultivo PDA líquido. Cada dilución fue colocada en caja Petri o láminas porta-objetos, según el tipo de ensayo.

Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica se evaluó por la inhibición del crecimiento micelial del hongo y de la germinación determinada por la técnica de microcultivo. Las esporas del hongo (1×10^6 esporas/ml) fueron colocadas sobre una lámina porta-objetos con PDA con diferentes diluciones de los AEs (200 a 1000 $\mu\text{g/ml}$).

Cuadro 2. Composición de los aceites esenciales (AE), principales en especies del género *Lippia*.

AE	Planta (especie)	Voucher	Lugar de recolección	Componentes mayoritarios (Cantidad relativa, %)
1	<i>Lippia citriodora</i>	COL 484334	Rionegro, Antioquia	Geranial (22.0), neral (18.6), limoneno (8.1), espatulenol (4.7), 1,8-cineol (3.5), <i>trans</i> - β -cariofileno (2.5).
2	<i>Lippia origanoides</i>	COL 520285	Pedregal, Nariño	Timol (54.5), <i>p</i> -cimeno (10.0), γ -terpineno (5.0), acetato de timilo (4.8), β -mirceno (2.8), <i>trans</i> - β -cariofileno (2.4), carvacrol (1.7).
3	<i>Lippia origanoides</i>	COL 517741	Soatá, Boyacá	Timol (43.8), carvacrol (17.3), <i>p</i> -cimeno (12.1), γ -terpineno (6.2), acetato de timilo (4.8), β -mirceno (3.0), <i>trans</i> - β -cariofileno (2.2).
4	<i>Lippia alba</i>	COL 480750	Bolívar, Santander	Carvona (38.3), limoneno (28.8), biciclosesquifelandreno (6.5), piperitenona (3.5), β -bourboneno (3.0), piperitona (2.0).
5	<i>Lippia alba</i>	COL 480750	Bucaramanga, Santander	Carvona (53.0), biciclosesquifelandreno (16.4), limoneno (11.0), piperitenona (3.6), piperitona (2.5), β -bourboneno (1.5).

La esporulación se determinó por recuento microscópico cada 6 h durante 48 h. Como espora germinada se consideró aquella que mostraba la presencia de un tubo germinal incipiente o completamente desarrollado. Como control se realizaron preparaciones sin AE. El porcentaje de germinación se determinó al dividir la cantidad de esporas germinadas por el total de esporas encontradas, que fue de 300 esporas. El porcentaje de inhibición de la germinación se calculó utilizando la ecuación siguiente: $100 - [(Tx100)/C]$, donde T son los valores del tratamiento y C los valores del control (Saldarriaga y Pineda, 2001). Cada ensayo se repitió dos veces.

La inhibición del crecimiento micelial se determinó de forma macroscópica, colocando en cajas Petri un fragmento de la colonia del hongo sobre medio PDA que contenía diferentes diluciones de AEs (200 a 500 $\mu\text{g/ml}$), y en un experimento adicional se evaluaron concentraciones inferiores (25 y 50 $\mu\text{g/ml}$) pero sólo con la cepa ATCC. El crecimiento micelial fue determinado midiendo el diámetro (en cm) de las colonias durante 21 días. Como control negativo se realizaron preparaciones sin AE. La inhibición del crecimiento micelial se calculó usando la misma fórmula anterior $100 - [(Tx100)/C]$ donde T son los valores del tratamiento y C los valores del control Saldarriaga y Pineda (2001). Cada ensayo se repitió dos veces.

Análisis de resultados

Para medir la actividad fúngica, cada concentración de AE se evaluó por triplicado y los ensayos fueron realizados por duplicado. Para medir las diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba 't' de Student a un nivel de significancia de 5%.

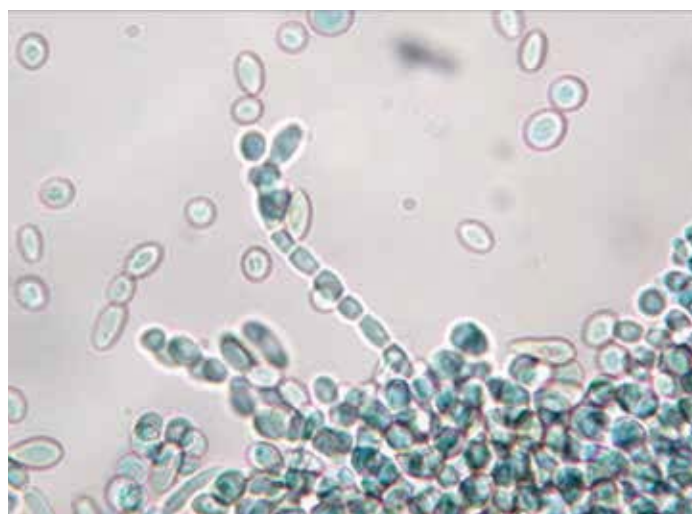
Resultados y discusión

Las características morfológicas y de crecimiento entre los aislados de *Moniliophthora roreri* obtenidos directamente de los frutos enfermos de cacao mostraron una alta variabilidad, lo que concuerda con los hallazgos de Grisales y Afanador (2007). Las colonias presentaron aspecto pulverulento con colores beige a marrón (Foto 1). En microscopio se observaron hifas hialinas septadas y conidias catenuladas ovoides o redondas (Barnet *et al.*, 2002). Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento micelial de los hongos en ambos medios de cultivo ($P < 0.05$); 21 días después de la inoculación, los aislados en MEA presentaron un rango de crecimiento radial entre 4.2 y 5.0 cm y en PDA entre 3.7 y 4.5 cm (Cuadro 1).

Todos los AE evaluados mostraron actividad antifúngica e inhibieron totalmente la germinación de las esporas, cuando fueron utilizados en concentraciones altas (600 - 1000 $\mu\text{g/ml}$). Los AEs obtenidos de *L. origa-*



A. Aspecto macroscópico de las colonias.



B. Morfología microscópica de las colonias.

Foto 1. Características macroscópicas y microscópicas de los aislados M2 de *Moniliophthora roreri*.

noides (AE2 y AE3) fueron los más activos cuando se aplicaron en concentraciones de 200 µg/ml, e inhibieron la germinación del aislado M2 en más del 90% (Cuadro 3, Figura

1). El grado de inhibición presentada por los AEs en el aislado M2 fue similar al presentado en la cepa ATCC ($P > 0.05$), excepto el AE3 que en concentraciones de 200 µg/ml fue siete

Cuadro 3. Efecto de aceites esenciales (AEs) en la germinación y el crecimiento micelial del aislado M2 y de la cepa de referencia ATCC. Resultados en hongos tratados con 200 µg/ml de AE.

Planta/control	Inhibición de la germinación (% ±DE)*		Inhibición del crecimiento micelial (% ±DE)**	
	M2	Cepa ATCC	M2	Cepa ATCC
<i>L. citriodora</i> (AE1)	42.27±1.09	41.56±0.50	31.71±1.13 ^b	11.22±0.07 ^b
<i>L. organoides</i> (AE2)	93.86±1.39	86.11±3.30	100 ^c	59.18±2.83 ^c
<i>L. organoides</i> (AE3)	96.90±0.70 ^a	12.71±0.28 ^a	100 ^d	59.18±2.83 ^d
<i>L. alba</i> (AE4)	36.89±0.53	66.04±2.38	2.94±0.18	22.45±0.99
<i>L. alba</i> (AE5)	70.17±0.00	38.04±6.17	6.40±0.02	32.14±0.46
AmB ¹	100	100	100	100

* 48 h post-inoculación; ** 21 días post-inoculación; DE: Desviación estándar; ¹ la concentración de AmB utilizada fue 0.01 µg/ml. a, b, c, d: valores de P entre el aislado M2 y la cepa de referencia ATCC con significancia estadística ($P < 0.05$).

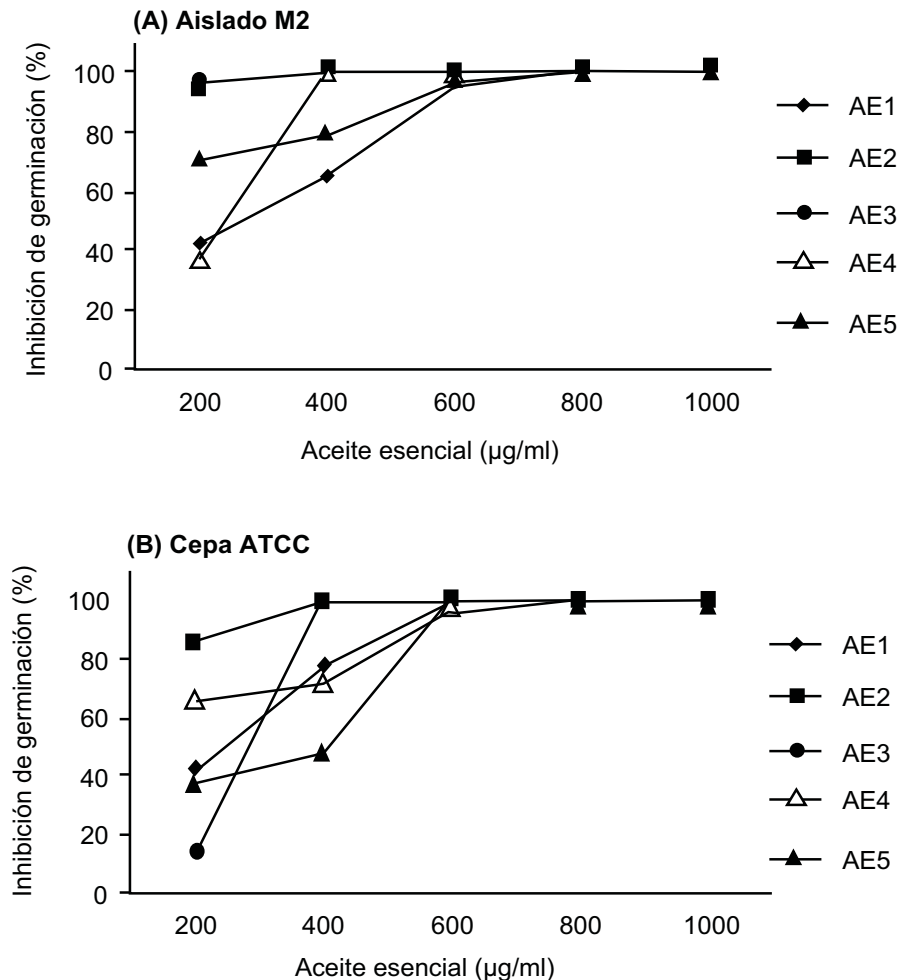


Figura 1. Efecto de aceites esenciales (AE) en la inhibición de la germinación del aislado M2 (A) y la cepa ATCC (B). AE1 de *L. citriodora*, AE2 de *L. organoides*, AE3 de *L. organoides*, AE4 de *L. alba* y AE5 de *L. alba*.

veces más activo en la cepa M2 (Cuadro 3). La actividad similar de los AEs en las cepas evaluadas evidencia la conservación de las características de susceptibilidad del hongo, a pesar de la adaptación de los aislamientos en condiciones de laboratorio. Por otra parte, la fuerte actividad del AE de *L. origanoides* sobre la germinación de las esporas de *M. roreri* posiblemente está relacionada con el efecto del timol como componente mayoritario de este AE. Estudios previos demostraron que este componente afecta principalmente la pared celular de las conidias impidiendo su germinación y crecimiento (Svircev *et al.*, 2007).

Todos los AEs incluidos en el estudio inhibieron 100% el crecimiento del hongo, cuando fueron utilizados en concentraciones de 800 y 1000 µg/ml, exceptuando el AE4 que en las mismas concentraciones inhibió 53.43 y 76.47% del hongo, respectivamente. De forma similar al efecto mostrado en la inhibición de la germinación, los AEs obtenidos de *L. origanoides* (AE2 y AE3) en concentraciones de 200 µg/ml fueron los más activos e inhibieron 100% del crecimiento micelial (Cuadro 3). Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en la capacidad inhibitoria de los AEs entre las cepas M2 y ATCC, siendo los AE1, AE2 y AE3 más activos para el aislado M2 que para la cepa ATCC (Cuadro 3). Cuando se aplicaron concentraciones menores que 25 y

50 µg/ml, la inhibición del crecimiento de la cepa ATCC sólo fue de 20% (Figura 2); para el aislado M2 no se evaluaron concentraciones menores que 200 µg/ml de AE.

La AmB en concentración de 200 µg/ml presentó un nivel de inhibición de 100% en la germinación y el crecimiento micelial tanto del aislado como de la cepa de referencia. La actividad inhibitoria de este producto ha sido ampliamente demostrada para hongos que afectan humanos o plantas (Mesa-Arango *et al.*, 2009).

Los componentes principales de los AE utilizados en este trabajo aparecen en el Cuadro 2. Los aceites más activos (AE2 y AE3) de *L. origanoides* muestran una composición química similar, aunque en porcentajes diferentes, así, timol, carvacrol y *p*-cimeno están en proporción de 54.5, 1.7 y 10.0% en el AE2 y de 43.8, 17.3 y 12.1% en el AE3. Estos componentes se encuentran puros o como constituyentes principales en AE obtenidos de plantas como *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Thymbra spicata*, *Satureja thymbra*, *Salvia fruticosa*, *Lavandula sp.*, *Mentha piperita* y han mostrado previamente actividad contra hongos fitopatógenos (Muller-Riebau *et al.*, 1995; Zambonelli *et al.*, 1996; Lee, 2007). El timol ha sido utilizado en forma de vapores sobre frutos infectados por *Monilinia fructicola* para reducir la viabilidad de las esporas

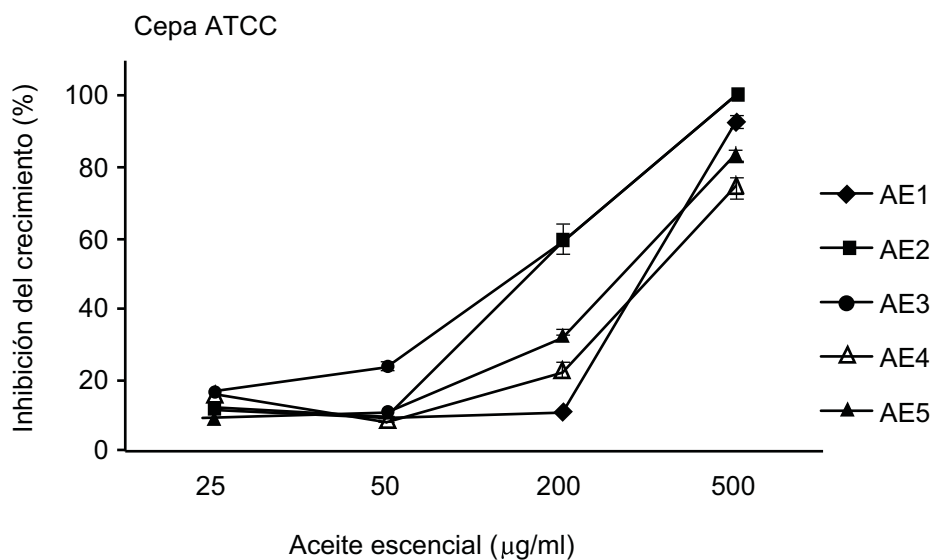


Figura 2. Efecto de aceites esenciales (AEs) en la inhibición del crecimiento de la cepa de referencia ATCC. AE1 de *L. citriodora*, AE2 de *L. origanoides*, AE3 de *L. origanoides*, AE4 de *L. alba* y AE5 de *L. alba*.

alterando la membrana celular, así como la formación de tubos germinales y apresorios estructuras indispensables para el inicio de la infección en los tejidos vegetales (Svircev *et al.*, 2007).

En este trabajo los AE4 y AE5 de *L. alba*, compuestos principalmente por carvona y limoneno, aunque también inhibieron la germinación y el crecimiento del hongo, fueron menos activos. El AE de *L. scaberrima*, compuesto también principalmente por carvona y linomeno, han mostrado actividad contra hongos fitopatógenos cuando se usan en concentraciones de 2000 mg/ml (Regnier *et al.*, 2010).

Conclusiones

- Todos los AEs mostraron actividad antifúngica cuando fueron evaluados en concentración de 200 µg/ml. Los AE de *L. origanoides* fueron los más activos.
- Por los hallazgos de actividad de los AE evaluados sobre el crecimiento y germinación del hongo fitopatógeno *M. roleri*, se proponen las mezclas de compuestos naturales como posibles agentes para el control de la moniliasis de cacao.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo logístico de los doctores Fabio Aranzazu y Darwin Martínez del Departamento de Investigación de la Federación Nacional de Cacaoteros, Fedecacao. El presente trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander (Proyecto Código 5648) y el Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (Cenivam), Contrato RC-245-2011 Colciencias (Patrimonio Autónomo del Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas).

Referencias

Barnett, H. L. y Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3th edition. Minneapolis: Burgess Publ. Co. p. 241.
Deka Bhuyan, P.; Chutia, M.; Pathak, M. G.; y Ba-

ruah, P. 2010. Effect of essential oils from *Lippia geminata* and *Cymbopogon jwarancusa* on in vitro growth and sporulation of two rice pathogens. J. Am. Oil Chem. Soc. 87 (11):1333 - 1340.
Escobar, P.; Leal, S. M.; Herrera, L. H.; Martínez, J.R.; y Stashenko, E. 2010. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp. essential oils and their major components. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105:184 - 190.
Evans, H. C. 2002. Invasive neotropical pathogens of tree crops. En: Watling, R; Frankland, J. C.; Ainsworth, A. M.; Isaac, W.; y Robinson, C. H. (eds.). Tropical mycology. 2: Micromycetes. Wallingford, Oxon. CABI Publishing. Pp. 83-112.
Evans, H. C.; Stalpers, J. A.; Samson, R. A.; y Benny, G. L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roleri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. Can. J. Bot. 56:2528 - 2532.
Grisales, S. y Afanador, L. 2007. Análisis de variabilidad genética de *Moniliophthora roleri* con AP-PCR y RAPD en Antioquia, Colombia. Rev. Col. Biotec. 9:15 - 32.
Hebbar, P. K. 2007. Cacao diseases: A global perspective from an industry point of view. Phytopath. 97:1658 - 1663.
Hennebelle, T.; Sahpaz, S.; Dermont, C.; Joseph, H.; y Bailleul, F. 2006. The essential oil of *Lippia alba*: Analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. Chem. Biodivers. 3:1116 - 1125.
Kordali, S.; Cakir, A.; Ozer, H.; Cakmakci, R.; Kesdek, M.; y Mete, E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. Bioresour. Technol. 99:8788 - 8795.
Lee, S. O.; Ja, G. K.; Soo, K. J.; Kyoung, H. L.; Yun, K. C.; y Jin-Cheol, K. 2007. The antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathol. J. 23:97 - 102.
Linde, J. H.; Combrinck, S.; Regnier, T. J. C.; y Virije-
vic, S. 2010. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lippia rehmannii* from South Africa. SudAfr. J. Bot. 76:37 - 42.
Meneses R.; Torres F.; Stashenko E.; y Ocazonez, R. 2009. Aceites esenciales de plantas colombianas inactivan el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla. Salud UIS. 41:236 - 243.
Mesa-Arango A.; Montiel-Ramos J.; Zapata B.; Durán C.; Betancur-Galvis E.; y Stashenko, E. 2009. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 104:878 - 884.
Muller-Riebau, F.; Berger, B.; y Yegen, O. 1995.

- Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* 43:2262 - 2266.
- Olivero, J.; Caballero, G. K.; Jaramillo, C. B.; y Stashenko, E. 2009. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, *Herbst. Salud UIS.* 41:244 - 250.
- Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez, M. D.; y Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnophar.* 76:201 - 214.
- Phillips-Mora, W. y Wilkinson, M. J. 2007. Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopath.* 97(12):1644 - 1647
- Pitarokili, D. P.; Tzakou, O.; Loukis, A.; y Harvala, C. 2003. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 51:3294 - 3301.
- Prabhakaran, K. P. 2010. The agronomy and economy of important tree crops of important developing world. Amsterdam, Boston: Elsevier. Pp. 131 - 180.
- Regnier, T.; Combrinck, S.; y Du Plooy, W. 2010. Evaluation of *Lippia scaberrima* essential oil and some pure terpenoid constituents as postharvest mycobiocides for avocado fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 57:176 - 182.
- Saldarriaga, Y. y Pineda, F. 2001. Aislamiento de hongos fitopatógenos. Manual de Micología Aplicada. Medellín: Universidad de Antioquia (eds.). Pp. 65 - 74.
- Stashenko, E.; Martínez, J. R.; Ruíz, C. A.; Arias, G.; Duran, C.; Salgar, W.; y Cala, M. 2010. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.* 33:93 - 103.
- Svircev, A.; Smith, R.; Zhou, T.; Hernandez, M.; Liu, W.; y Chu, C. L. 2007. Effects of thymol fumigation on survival and ultrastructure of *Monilia fruticola*. *Postharvest Biol. Technol.* 45:228 - 233.
- Zambonelli, A.; D'Aulerio, A. Z.; Bianchi, A.; y Albasini, A. 1996. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *J. Phytopathol.* 144:491 - 494.