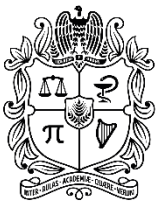


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

MICROORGANISMOS ENDÓFITOS COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE HONGOS PATOGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE AGUACATE EN COLOMBIA.

DIANA MILENA ORJUELA CORCHUELO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2018

MICROORGANISMOS ENDÓFITOS COMO ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE HONGOS PATOGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE AGUACATE EN COLOMBIA.

Diana Milena Orjuela Corchuelo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Química

Director (a):

Qca. M.Sc. Dr. Sc MÓNICA CONSTANZA AVILA MURILLO

Línea de Investigación:

Química de productos naturales

Grupo de Investigación:

Estudio Químico y de Actividad Biológica de Rutaceae y Myristicaceae Colombianas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2018

A mi abuela que, aunque no vio el final de este proceso espero este orgullosa de su nieta, y a mi familia espero que se sientan orgullosos, sin ustedes esto no sería posible.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la vida y a Dios por permitirme vivir este corto, pero significativo proceso del cual he aprendido de manera personal y profesional.

A mi familia por ser siempre mi polo a tierra, a mis Padres Nubia y Arturo y a mi hermana Katherine por su apoyo en este camino, por ser un ejemplo de entereza, gracias a ellos estoy donde estoy.

A la línea de investigación de productos naturales de la Universidad Nacional de Colombia, por permitirme hacer este aporte teórico, a la profesora Mónica Ávila por su paciencia y exigencia, ¡he aprendido de una gran profesional y una gran mujer mil gracias!

Al profesor Luis Enrique Cuca, por permitirme hacer este trabajo teórico para la línea de investigación, a la profesora Erika Plazas por tenerme en cuenta para la realización de este trabajo.

No puedo dejar de lado aquellas personas en las que creyeron en mí como profesional, a los profesores Ana Patricia Rozo y Virgilio Sierra de la Universidad Central por su apoyo y ayuda.

A mis amigos, con los empecé un camino hace unos años atrás Dianis, Diego, Sandra, Angélica, Camila aunque nos vemos de manera ocasional, sabemos que estamos como un apoyo constante en nuestros planes personales y profesionales, también aquellos amigos que me he encontrado en el camino, los quiero mucho.

Gracias a cada uno por su apoyo, y el ánimo cuando más los necesite

GRACIAS……. MIL GRACIAS!!!!!!

Resumen

El aguacate (*Persea americana* Mill) es uno de los frutos tropicales más consumidos a nivel mundial, gracias a las propiedades que posee se ha venido presentando un aumento en la comercialización de productos derivados de este fruto, no obstante, el cultivo del aguacate a nivel mundial es susceptible a diversas amenazas fitopatógenas, de las cuales se resaltan 17 hongos causantes de diversas enfermedades, dos de ellos perjudican el territorio colombiano de manera significativa *Colletotrichum gloeosporioides* y *Phythopthora cinnamomi*, los cuales provocan la antracnosis y la pudrición de raíces en la planta de aguacate respectivamente, los métodos hasta ahora usados no son totalmente eficaces para el control de este tipo de patógenos y perjudican el medio ambiente.

Por esto es importante identificar métodos alternativos de control que no afecten ni la planta ni el medio ambiente, los productos derivados de diversas especies naturales se han convertido en una gran opción en el control de problemas relacionados con fitopatógenos, una de las fuentes de los compuestos naturales son los microorganismos endófitos los cuales residen en todas las especies botánicas y presentan una relación simbiótica con las mismas, donde la especie endófita provee protección con la producción de metabolitos secundarios a cambio de un nicho de alimentación y crecimiento óptimo.

La presente revisión pretende servir como insumo teórico de soporte de futuras investigaciones encaminadas a la búsqueda de bíocontroladores a partir de organismos endófitos, discutiendo y analizando sus mecanismos de acción y los procesos metodológicos que se usan en la determinación de la actividad.

Para esto la presente monografía contemplará las siguientes temáticas generales:

- Aguacate: generalidades, fitoquímica, usos, problemas fitosanitarios del cultivo

- Microorganismos endófitos, características biológicas, actividad antifúngica y/o potencial de defensa.
- Métodos procedimentales de aislamiento, extracción y purificación de microorganismos endófitos

Palabras clave: Aguacate, hongos fitopatógenos, hongos endófitos y metabolitos secundarios

Abstract

The avocado (*Persea americana* Mill) is one of the most consumed tropical fruits worldwide, due to the attributes that have been already presented, it has been increased in its comertialization. Nevertheless, the cultivation of avocado worldwide is susceptible to various phytopathogenic threats, of which 17 fungi causing various diseases are highlighted two of them harm the Colombian territory in a significant way *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phythopthora cinnamomi*, those cause anthracnose and root rot in the avocado plant respectively. The methods so far are not fully effective for the control of this type of pathogens and harm the environment.

Therefore is important identify methods of control that do not affect either the plant or the environment, the natural products from various natural species have become in a great option in the problems control related to phytopathogenic fungi, one of the source of the natural compounds are the endophytic microorganisms which reside in all botanic species and have a symbiotic relationship with themselves, where the endophytic species provides protection with the production of secondary metabolites in exchange for a niche of feeding and optimal growth

The present review aims to serve theoretical input to support the latest research aimed at the search of biocontrollers from endophytic microorganisms, analyzing and arguing the methodology, the action mechanisms and the methodological processes that are used in the activity determination.

For this the present monograph contemplates the following general subjects:
• Avocado: generalities, phytochemical, uses, phytosanitary problems of the crop

• Endophytic microorganisms, biological characteristics, antifungal activity and / or defense potential.
• Procedures for isolation, extraction and purification of endophytic microorganisms.

Contenido

Pág.

Resumen 4
Lista de figuras 10
Lista de tablas 13
Lista de Símbolos y abreviaturas 14
INTRODUCCIÓN……...16
1.METODOLOGIA 21

2. RESULTADOS 23
2.1 .Persea americana Mill: ORIGEN Y TAXONOMIA…….24
2.1.1. Descripcion morfológica del aguacate……25
2.1.2. Razas o grupos ecológicos……....26
2.1.3. Variedades en Colombia…….27
2.1.4. Usos del aguacate……28
2.1.5. Fitoquímica del aguacate ……30
2.1.5.1.Fitoquímica de las hojas del aguacate…….....31
2.1.5.2.Fitoquímica del fruto y la semilla del aguacate……31
2.1.6. Problemas fitosanitarios del cultivo de aguacate…….34
2.1.6.1. Phythopthora cinnamomi ……..36
2.1.6.1.1. Características biológicas, condiciones de crecimiento, mecanismos de infección……...37
2.1.6.1.2. Pérdidas ocasionadas por infección del patógeno *Phythopthora cinnamomi*……39
2.1.6.1.3. Métodos de control ……40
2.1.6.2.Colletrotichum gloesporoides…….44
2.1.6.1.4. Características biológicas, condiciones de crecimiento, mecanismos de infección……...44
2.1.6.1.5. Pérdidas ocasionadas por infección de *Colletrotichum gloesporoides*……..46
2.1.6.1.6. Métodos de control……46
2.2. MICROORGANISMOS ENDÓFITOS ……...50
2.2.2. Clasificación de los microorganismos endófitos……..50
2.2.1.1.Bacterias endófitas……...51
2.2.1.2.Hongos endófitos……..52

2.2.1.2.1.Caracterisiticas biológicas principales de los hongos endófitos…….....55
2.2.1.2.2.Metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos y sus acciones biológicas……56
2.2.1.2.3.Hongos endófitos con actividad antifúngica o con potencial en defensa vegetal……..59
2.2.1.2.4.Mecanismos de acción de hongos endófitos contra hongos fitopatógenos……78
2.2.1.2.5.Métodos de aislamiento……...79
2.2.1.2.6.Métodos de fermentación……82
2.2.1.2.7.Métodos de extracción……85
3. CONCLUSIONES……..90
4. RECOMENDACIONES ……91
5. Bibliografia…..……....92

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Ejemplo de la ruta diseñada de la búsqueda de la literatura científica…….22

Figura 2. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "Aguacate" y su análisis por área temática…….24

Figura 3. Características morfológicas de la planta del aguacate……..26

Figura 4. Principales variedades de aguacate sembradas en el país……28

Figura 5. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "Usos del aguacate" y su análisis por área temática…….29

Figura 6. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "fitoquímica del aguacate"……30

Figura 7. Flavonoides aislados de *Persea americana*…….....31

Figura 8. Metabolitos secundarios encontrados en la cascara del aguacate con acción anticancerígena y antiinflamatoria……..32

Figura 9. Metabolitos con actividad insecticida y antifúngica aislados del fruto del aguacate…….32

Figura10. Compuestos con actividad biológica aislados de la semilla del aguacate…….33

Figura 11. Acciones farmacológicas de diferentes partes del aguacate. ……33

Figura 12. Enfermedades de la planta de aguacate en Colombia causadas por diversos hongos fitopátogenos…….35

Figura 13. Pudrición de raíces causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi* y antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* ……..36

Figura 14. Diagrama del ciclo de vida del hongo *Phytophthora cinnamomi* ……....38

Figura 15. Principales síntomas de infección en el árbol del aguacate a causa de *Phytophthora cinnamomi* ……39

Figura 16. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "control de *Phytophthora cinnamomi*"……..40

Figura 17. Estructuras químicas de los fungicidas utilizados para el control de *Phytophthora cinnamomi*……41

Figura 18. Estructuras de los terpenos más abundantes en los aceites esenciales activos contra *Phytophthora drechsleri*…….....43

Figura 19. Estructuras químicas de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales ensayados frente a *P capsici, P drechsleri y P melonis*……..44

Figura 20. Esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*…….45

Figura 21. Antracnosis en frutos de aguacate provocada por *Colletotrichum gloeosporioides*…..……..46

Figura 22. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "control de *Colletotrichum gloeosporioides*" …….47

Figura 23. Estructuras químicas de los terpenos más abundantes en los aceites esenciales activos frente a *Colletotrichum gloeosporioides*.....48

Figura 24. Quinonas activas aisladas de gromwell púrpura……..49

Figura 25. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "microorganismos endófitos" y su análisis por área temática ……..50

Figura 26. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: “hongos endófitos” y su análisis por área temática……53

Figura 27. Ciclo de vida de Basidiomycota……..55

Figura 28. Ciclo de vida de Ascomycota.……55

Figura 29. Representación de una relación tripartita entre una planta, su comunidad endófita, y un tercer organismo, por ejemplo, un hongo patógeno…….59

Figura 30. Proceso de aislamiento, purificación y fermentación de microorganismos endófitos……80

Figura 31. Aislamiento y crecimiento primario de colonias de hongos endófitos provenientes de diversos tejidos……82

Figura 32. Estimación del tiempo requerido para la fermentación de hongos y el tratamiento de extractos de medio líquido a pequeña escala……..84

Figura 33. Estimación del tiempo requerido para la fermentación de hongos y el tratamiento de extractos de medio líquido a gran escala……..85

Figura 34. Estimación del tiempo requerido para la fermentación de hongos y el tratamiento de extractos de medio solido a pequeña escala……85

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Persea americana* Mill ……25

Tabla 2. Principales características por tipo de variedad de aguacate ……27

Tabla 3. Principales usos del aguacate. ……29

Tabla 4. Bacterias endófitas presentes en algunas plantas …….. 52

Tabla 5. Grupos y clases de hongos endófitos …… 54

Tabla 6. Acción biológica encontrada en compuestos aislados en hongos endófitos.....57

Tabla 7. Acción antifúngica encontrada en compuestos aislados en hongos endófitos……....60

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AA	Acido araquidónico.
DCM	Diclorometano
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EC_{50}	Concentración efectiva 50
EFS	Extracción en fase sólida
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FEL	Fermentación en estado liquido
g	Gramos
GBIF	Global Biodiversity Information Facility.
Ha	Hectarea
IC_{50}	Concentración inhibitoria 50
ICA	Instituto Colombiano de Agricultura
LC_{50}	Concentración letal
MIC	Concentración mínima inhibitoria
mm	Milimetros
MMDC	Concentración mínima de deformación morfológica

msnm	Metros sobre el nivel del mar
PDA	Agar de dextrosa de papa
PTP	Programa de Transformación Productiva.
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxigeno
VOC´s	Compuestoa organicos volátiles
µM	Micro-molar

INTRODUCCIÓN

Colombia es uno de los países que cuenta con una gran diversidad de cultivos, gracias a la variedad de suelos y condiciones climáticas (Nieto, 2012). Actualmente uno de los productos agrícolas con gran relevancia es el aguacate (Persea americana Mill), considerado como el quinto fruto tropical más importante en el mundo medido en términos de volumen y área cultivada, con un total de 553.457 ha sembradas, y un total de 5.346.968 toneladas de fruta producida para el 2016 (FAO, 2018). En nuestro país hay varias regiones que se caracterizan por ser pioneras en el cultivo de este producto dentro de las que se resaltan, la región caribe y los departamentos de Tolima y Antioquia, en este último se ha venido presentando un aumento en el cultivo de aguacate Hass, una variedad de alto consumo y de gran demanda según el Programa de Transformación Productiva (PTP) del Ministerio de Agricultura, el cual busca el aumento de las exportaciones de aguacate (El mundo, 2014). En un panorama general las exportaciones de este fruto han venido en aumento, para el 2015 se exportó un total de 2500 toneladas donde el principal destino fue la Unión Europea (Ministerio de Agricultura, 2014), no obstante el PTP del gobierno colombiano busca garantizar la inocuidad de la fruta y potencializar la producción de las diferentes variedades con el fin de incursionar a otros mercados internacionales, haciendo contrapeso al principal productor de este fruto (México); según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) México produce un 29,4% de aguacate, mientras que Colombia se ubica en el cuarto puesto con un 10,9% del total de producción mundial (FAO, 2018).

El alto consumo y demanda que presenta el aguacate en nuestro país, y a nivel internacional se debe a los diferentes beneficios y usos que trae consigo este fruto, dentro de los cuales se destaca: el culinario, farmacéutico, y cosmético (Vega, 2012). Los

beneficios que se le adjudican al consumo de aguacate son: alto contenido proteico, presencia de minerales como Mg, Ca, Fe, Al, Zn, presencia de ácidos grasos insaturados, que generan efectos benéficos para la salud, entre los cuales se destaca la disminución de triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad en personas sanas y con problemas de diabetes e hipercolesterolemia, aumento en la síntesis de colágeno, disminución del número de células inflamatorias en el proceso de reparación de heridas y alto efecto antioxidante, de esta última propiedad son responsables algunos metabolitos secundarios como los carotenoides, ácidos fenólicos y flavonoides (Robayo,2016).

A pesar de la alta demanda de producción y consumo del aguacate, el cultivo de este fruto se encuentra expuesto a diferentes problemas fitosanitarios, provocando una disminución en la cantidad y calidad del producto final. En Colombia los mayores reportes de pérdidas en el cultivo de aguacate se deben a las enfermedades fúngicas, dentro de los hongos que afectan la planta y el fruto del aguacate se encuentran: *Verticillium*. spp, agentes causales de la marchitez, *Sphaceloma perseae* causante de la roña, *Glomerella cingulata* productor de la mancha angular de la hoja, *Pseudocercospora* spp que provoca mancha negra del fruto, *Colletotrichum gloeosporioides* causante de antracnosis de fruto y *Phytophthora cinnamomi* causante de la pudrición de raíces, conocida comúnmente como la tristeza del aguacatero (Tamayo, 2007); esta última de gran relevancia en nuestro país ya que a causa de esta enfermedad se perdió más del 50% de los árboles de aguacate en la zona del caribe colombiano. (Contexto ganadero, 2014)

Hasta el momento se han encontrado soluciones parciales a las implicaciones y la presencia de hongos fitopatógenos en el cultivo de aguacate, entre las que se destacan: variedades que son genéticamente resistentes (Vega, 2012); buenas prácticas agrícolas en la etapa de siembra y el uso de agroquímicos cuando se evidencian síntomas; hay una gran variedad de productos químicos que contraatacan las lesiones que causan diferentes microorganismos o en última instancia producen la eliminación de los mismos, sin embargo el continuo uso de estos compuestos de síntesis química puede conducir a daños directos y colaterales, como la reducción de raíces adventicias y el largo de la raíz principal de la planta, la alta contaminación ambiental, y el aumento en los costos de producción. El panorama anterior evidencia la necesidad de buscar alternativas que ayuden a

contrarrestar los efectos dañinos de las plagas y que a su vez sean amigables con el ambiente (Pérez, 2014).

Los productos naturales han sido una gran herramienta, desde tiempos ancestrales y con conocimiento basado en la experiencia han ayudado al control de plagas y enfermedades en diferentes cultivos (Pino, 2010); la procedencia de estos puede ser diversa e incluye fuentes vegetales, fúngicas y de origen marino. En los últimos años se ha evidenciado que los organismos endófitos asociados a muchas especies vegetales producen metabolitos secundarios con acción antifúngica (Avalos, 2009). Se ha encontrado que en la misma especie botánica coexisten tanto los microorganismos benéficos como las especies patógenas, provocando un papel de antagonismo y una competencia por el nicho donde habitan (Prado et al, 2012). Estos microrganismos endófitos pueden residir en los tejidos de las plantas realizando procesos de mutualismo que generan la producción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que en muchos casos se encargan de brindar protección y resistencia a fitopatógenos (Manrique et al, 2014), la eficacia de estos organismos depende de factores como: la especificidad del huésped, la capacidad de movimiento dentro de los tejidos vegetales y la inducción de resistencia sistémica.

Teniendo en cuenta el panorama anterior, considerando la importancia del cultivo de aguacate y que hasta el momento no existe un método eficaz para el tratamiento de las infecciones fúngicas que lo aquejan; es prioritaria la investigación para generar opciones de control y manejo a esta problemática. Por esto diferentes sectores de la academia han orientado sus investigaciones en la búsqueda de soluciones teniendo en cuenta el conocimiento tradicional que existe del uso ancestral de la biodiversidad.

El grupo de Investigación “Estudio Químico y de actividad biológica de Rutáceas y Myristicaceas Colombianas” de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá, fue creado en el año de 1984 y se ha consolidado como uno de los grupos pioneros en la investigación de productos naturales vegetales en Colombia. Desde su conformación, el objetivo central de este grupo ha sido la investigación fitoquímica y quimiotaxonómica; de esta forma se ha contribuido al conocimiento químico de especies de las familias Myristicaceae, Rutáceae, Lauraceae, Piperaceae y Solanaceae, principalmente. En los últimos años los estudios fitoquímicos se han enfocado en la búsqueda de metabolitos secundarios activos de esas familias botánicas, con miras al desarrollo de posibles agentes

fitosanitarios y terapéuticos; con el objetivo de contribuir al aprovechamiento sostenible de la Biodiversidad Colombiana. Dentro de las investigaciones en la línea de bioprospección de agentes fitosanitarios, la cual comenzó hace cerca de 12 años, orientada a la generación continua de alternativas de control de enfermedades fúngicas que generan pérdidas en el rendimiento y calidad de cultivos de interés comercial para nuestro país, entre los cuales se destacan el clavel, el tomate chonto, las pasifloras, el tomate de árbol y el aguacate.

Nuestras investigaciones nos han permitido determinar los géneros botánicos y las especies más promisorias como fuentes de productos naturales con actividad anti fúngica, numerosos compuestos activos, y en algunos casos determinar la relación de la estructura de estos con la actividad; demostrando que las especies vegetales son una fuente muy importante de agentes que pueden ser usados para defensa vegetal en la agroindustria, (Kalvo, 2016), (Albarracín, 2016), (Patiño, 2015), (Moreno, 2011), (Parra, 2011), (Pabón, 2009), (Muñoz, 2008), (Albarracín et al, 2017), (Albarracín et al, 2017), (Parra et al, 2013), (Ávila et al, 2011), (Parra et al, 2011), (Prieto et al, 2011), (Prieto et al, 2010), (Patiño et al, 2010), (Pabón et al, 2010), (Celis et al, 2008), (Prieto et al, 2013).

Teniendo en cuenta nuestra experiencia y la literatura científica reciente, en la que se establece que los metabolitos presentes en las especies vegetales que tienen actividad en defensa, son en muchos casos proporcionados por los microorganismos simbiontes de dichas especies los cuales se denominan microorganismos endófitos; hemos abordado este campo de estudio con el ánimo de ampliar nuestro horizonte de prospección de opciones efectivas de control de enfermedades fúngicas. La investigación en microorganismos como fuente de agentes de control de plagas es un campo relativamente reciente de estudio que resulta tener bastante futuro, ya que además de que estos son fuente de metabolitos muy activos, son una fuente que permite hacer aprovechamiento sostenible ya que tienen la ventaja de poderse cultivar, obteniendo biomasa en poco tiempo, y permitiendo que las variaciones de las condiciones de cultivo en muchos casos mejoren las condiciones de actividad biológica.

La presente revisión pretende servir como un soporte teórico a las investigaciones que se adelantan en la línea de bioprospección de productos fitosanitarios del grupo de Investigación “Estudio Químico y de actividad biológica de Rutáceas y Miristicáceas

Colombianas" de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá, que estén encaminadas a la búsqueda de biocontroladores que provengan de organismos endófitos.

1. METODOLOGÍA

La metodología usada para el presente trabajo se basa en la consulta de la información referente al objeto de esta revisión en plataformas gubernamentales, organizaciones internacionales, y bases de datos científicas contemplando los reportes de los años 2000 a 2018, a continuación se presentan la lista de las páginas consultadas:

- http://www.ica.gov.co/
- https://www.minagricultura.gov.co
- https://www.fao.org.co
- https://www.tolima.gov.co
- https://www.antioquia.gov.co
- http://www.sciencedirect.com
- http://www.scielo.org/php/index.php?lang=es
- https://www.scopus.com
- http://www.americalatina.elsevier.com/corporate/es/scopus.php
- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
- https://www.scifinder.cas.org

En las plataformas consultadas, las rutas de consulta se construyeron mediante el uso de motores de búsqueda que incluyeron palabras clave acordes al tema de estudio combinadas con operadores lógicos, que permiten conectar de forma adecuada conceptos o grupos de términos para así ampliar, limitar o definir la búsqueda rápidamente. A continuación, se presenta un ejemplo de ecuación utilizada en la base de datos SCOPUS:

"TITLE-ABS-KEY ((endophyte **and** microorganisms) (control methods **and/or** colletotrichum **and** gloeosporioides) (phytochemistry of **and/or** avocado) (natural **and/or** antifungals **and/or** against colletotrichum **and/or** gloeosporioides)(isolation of secondary metabolites **and/or** of endophytic **and/or** fungi)(endophytic **and** fungi))"

La información más relevante de la búsqueda realizada se muestra en este documento, la clasificación de la misma se realizó teniendo en cuenta factores incluyentes y excluyentes, los cuales se determinaron a partir de los resultados arrojados por las diferentes plataformas consultadas (artículos, documentos institucionales, etc.) y los cuales fueron dependientes de los operadores de búsqueda usados; la depuración de toda la información se realizó de forma manual. En la **Figura 1** se presenta un ejemplo de la ruta diseñada para la búsqueda de literatura científica usando el motor "microorganismos endófitos", de la misma forma se hizo con los demás parámetros contemplados en esta revisión.

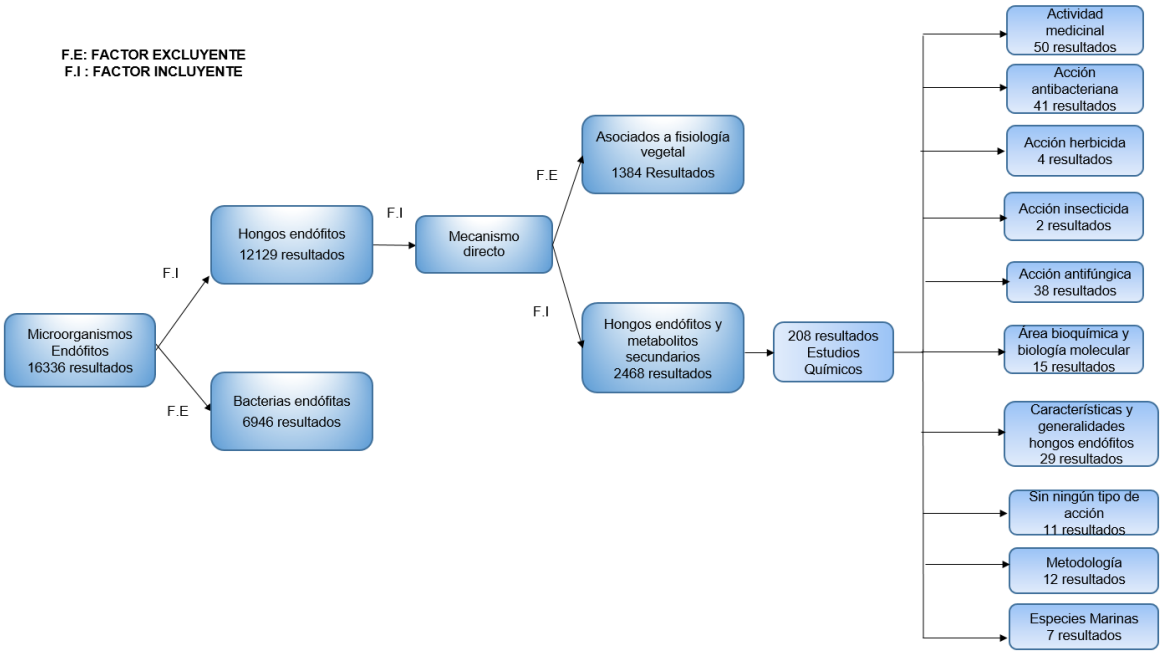


Figura 1. Ejemplo de la ruta diseñada de la búsqueda de la literatura científica

2. RESULTADOS

Teniendo en cuenta el objeto de esta revisión, a continuación, realizaremos la descripción de los resultados obtenidos para cada parámetro de búsqueda contemplado, comenzaremos tratando los aspectos más relevantes que tienen que ver con el cultivo del aguacate en lo consultado en las diferentes bases de datos en los años comprendidos entre el 2000 y 2018. En la **Figura 2** se muestra el total de publicaciones presentadas por la base de datos SCOPUS, el cual corresponde a 2701; para el año 2000 se reportan cerca de 75 publicaciones y la tendencia del gráfico del número de documentos por año evidencia un aumento sustancial, de tal forma que para el 2017 existen cerca de 253 publicaciones. El área temática que ha concentrado el mayor número de reportes es el estudio de la agricultura (60.7%), seguido por los reportes obtenidos por investigaciones relacionadas con el aguacate y sus beneficios en el tratamiento de patologías humanas (20.1%), características bioquímicas (17,4%), composición química (10%), farmacología (7%), y en mínima cantidad reportes científicos relacionados con otras áreas del conocimiento. En la **Figura 2** se presenta el diagrama de análisis de resultados de los documentos por área temática arrojado por la base de datos SCOPUS.

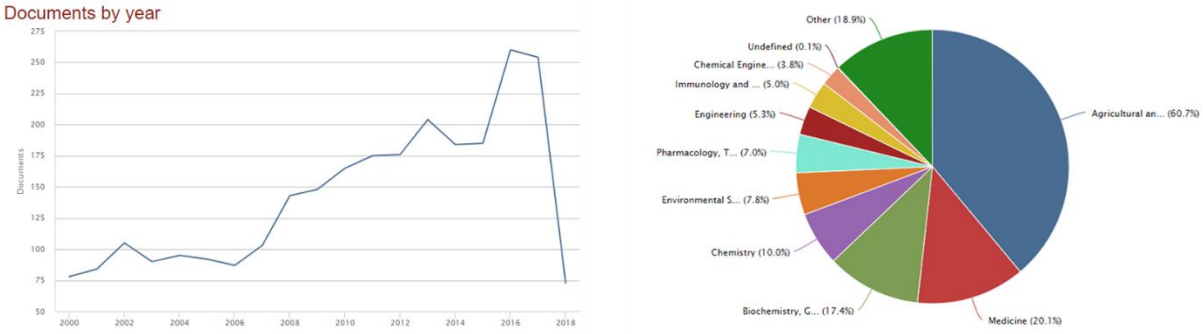


Figura 2. Documentos reportados por año 2000-2018, para el parámetro de búsqueda: "aguacate" y su análisis por área temática. Tomado base de datos SCOPUS

El aumento en los reportes científicos y el interés en el estudio del aguacate en sus diferentes flancos de investigación, es consistente con el aumento del consumo y la comercialización del mismo ya que como lo hemos mencionado en anteriores apartes de este documento, posee ácidos grasos, vitaminas, carotenoides entre otros compuestos químicos los cuales se encuentran en la pulpa, cascara y semilla, que le permiten generar diversas propiedades que contribuyen a mantener la salud humana, (Ranade et al, 2015). A continuación, se muestra la información más importante sobre el aguacate, y los problemas más representativos que sufre el cultivo del mismo.

2.1. *Persea americana* Mill: ORIGEN Y TAXONOMÍA

El aguacate (*Persea americana* Mill) pertenece a la familia botánica Lauraceae es considerada una fruta arbórea y su origen se ubica en el continente americano, según reportes históricos y botánicos (Mejía, 2011), es considerada la quinta fruta tropical más importante en el mundo medida en términos de volumen y área cultivada (Vega 2012). El género *Persea* está compuesto por unas 85 especies reportadas y clasificadas que se encuentran a lo largo de toda norte y sur américa, los mayores productores de este fruto son: México, República Dominicana, Perú, Colombia, Indonesia, Brasil, Kenia, Estados Unidos, Chile y China (FAO, 2018). En la **Tabla 1** se presenta la clasificación taxonómica de la especie P. americana (GBIF, 2017).

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Espermatofita
SUBDIVISIÓN	Angiosperma
CLASE	Dicotiledónea
SUBCLASE	Dipétala
ORDEN	Ranales
FAMILIA	Lauraceae
GENERO	Persea
ESPECIE	Persea americana

Tabla 1. Clasificación taxonómica de Persea americana Mill.

2.1.1. Descripción morfológica del aguacate

Son árboles que alcanzan una altura de 10 a 20 metros aproximadamente, su tronco puede llegar a alcanzar un diámetro entre 30 y 60 cm, presenta dicogamia y protoginia, esto significa que las flores se abren dos veces, en la primera apertura actúan como flores femeninas y luego como masculinas, gracias a esto presenta dos ciclos florales (Whiley et ál., 2002). La raíz es pivotante, muy ramificada, puede tener hasta un metro de profundidad, sus raíces secundarias y terciarias se distribuyen superficialmente, presenta una corteza áspera y en ocasiones de manera longitudinal surcada. Su tallo es grueso y cilíndrico y sus hojas son de diferentes tipos desde redondeadas hasta lanceoladas, y con una terminación helicoidal (Nieto, 2012). En la **Figura 3** se presentan las principales características morfológicas del aguacate.

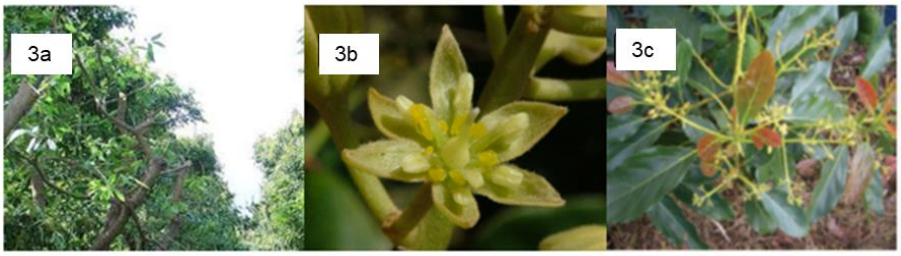


Figura 3. Características morfológicas de la planta del aguacate. **3a.** Árbol de aguacate Hass, imagen tomada dehttp://avofar.coml **3b.** Flor del árbol del aguacate en su estado femenino imagen tomada de www.agric.wa.gov.au **3c.** Hojas del árbol del aguacate imagen tomada de cartilla Manejo fitosanitario del cultivo de aguacate Hass ICA. 2012imagen tomada de cartilla Manejo fitosanitario del cultivo de aguacate Hass ICA. 2012.

El tamaño del fruto del árbol puede ser variable, presentando varias formas, dentro de las que se rescatan redondas, piriformes, ovoides, claviformes, abotellados, alargados, achatados entre otros (Lemus et ál. 2005). Posee corteza gruesa, con textura áspera, y variaciones gracias a los cruces naturales entre especies o a los cambios medio ambientales; el color del fruto en su exterior varía desde el verde oscuro a verde claro y amarillo, en su punto de extrema maduración presentan tonalidades marrones, rojizos, purpuras y negros. El color de la pulpa también varía pasando de tonos blanquecinos, verdes, verde-amarillos y amarillos.

2.1.2. Razas o grupos ecológicos

Varios botánicos desde 1934 han trabajado en el estudio taxonómico del aguacate, encontrando tres razas o subespecies principales de este fruto y de las cuales se derivan una gran cantidad de variedades, en la **Tabla 2** se describen las razas, y variedades de aguacate, junto a las características medioambientales necesarias para su cultivo y el promedio de grasa y azúcar del fruto en cada caso.

Raza	Altura (m.s.n.m.)	Temperatura (°C)	Altitud (mm)	Peso de fruto (g)	%grasa en fruto	%azúcar en fruto	Variedades
Antillana	Menor a 1000	18 - 26	75 - 250	250 - 2500	5 - 15	5	Lorena, Peterson, Wilson Simmonds, Booth 8, Catalina, Criollo
Guatemalteca	1000 - 2000	4 - 19	75 - 250	120 - 1500	5 - 15	5	Choquette, Hass, Simspson, Guatemala, Linda, Reed, Itzama, Fujikawa, Hall
Mexicana	más de 1700	Hasta 22	30 - 80	80 - 250	Hasta el 30	2	Azteca, Fuerte, Nabal, Ettinger, Bacon, Duke, Wurtz

Tabla 2. Principales características por tipo de variedad de aguacate. (Vega, 2012)

Cabe resaltar que, gracias a la polinización cruzada, entre especies naturales y artificiales, se presentan variedades conocidas como criollas.

2.1.3. Variedades en Colombia

En Colombia según los datos del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, para el 2014 las zonas con una participación representativa en el cultivo de aguacate son: Tolima (21%), Antioquia (15%), Caldas (13%), Costa caribe (17%), Santander (8%), Valle del Cauca (8%), (Ministerio de agricultura, 2015). En la **Figura 4** se muestran los ejemplares de algunas de las variedades de aguacate cultivadas en nuestro país. Las variedades más comunes sembradas son Trap ó Papelillo, con amplia presencia en los departamentos del Valle del Cauca y Tolima, estas se caracterizan por tener un tamaño mediano y peso promedio de 600 g (**Figura 4a y 4b**). También se cultivan variedades hibridas entre las cuales se destaca la variedad Santana de tamaño prominente, con un peso de 700 g (**Figura 4c**), esta variedad resulta de un cruce ente razas (gualtemalteca con antillano), la variedad Choquette presenta características similares a la variedad Santana (**Figura 4d**) y posee un peso que oscila entre los 1000 y 1100 g.

Una de las variedades más reconocidas y cultivadas en el mundo es el aguacate Hass (**Figura 4e**), su importancia radica en que es bastante apreciado por los mercados internacionales ya que contiene el más alto porcentaje de grasa insaturada cerca del 21%, posee tamaño pequeño, peso promedio de 18 g, su estado de maduración es fácilmente apreciable porque su cascara se torna morada y/u obscura, este se cultiva en la zona antioqueña del país principalmente.

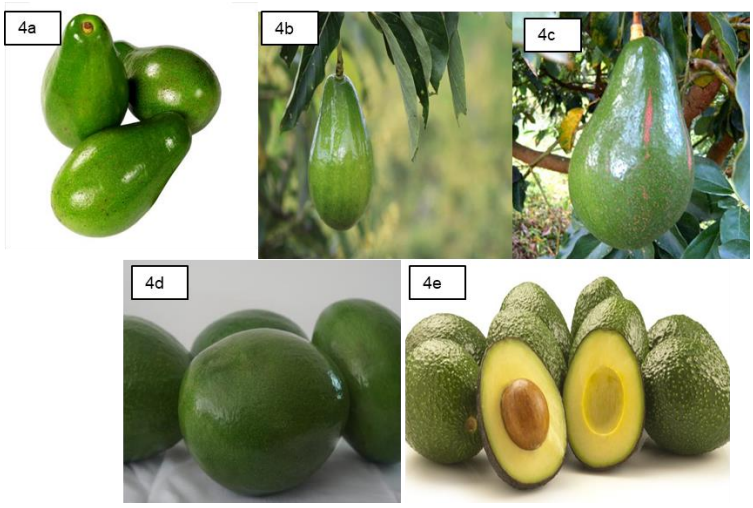


Figura 4. Principales variedades de aguacate sembradas en el país. **Figura 4a.** Aguacate Trapp o Papelillo. **Figura 4b.** Aguacate Lorena. **Figura 4c.** Aguacate Santana. **Figura 4d.** Aguacate Choquette. **Figura 4e.** Aguacate Hass. (GBIF, 2017)

2.1.4. Usos del aguacate

El aguacate es un producto agrícola de gran consumo, los usos dados a esta fruta son diversos, e incluyen la industria culinaria, cosmética y la etnomedicina; sectores en los que se comercializa tanto en fresco, como en productos procesados de forma masiva; razón por la que las publicaciones relacionadas respecto a “usos de aguacate” en la base de datos SCOPUS, en los últimos años muestran un incremento significativo como se observa en la **Figura 5**.

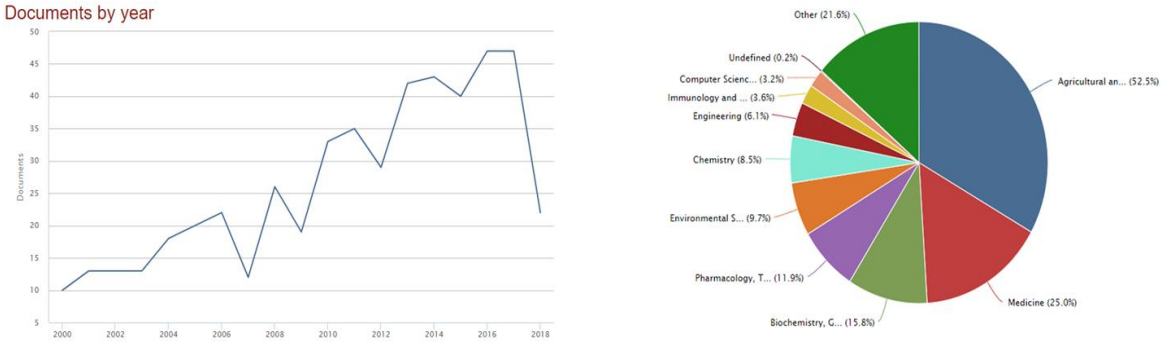


Figura 5. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "usos del aguacate" y su análisis por área temática. Tomado base de datos SCOPUS

Para el año 2000 se presentan 10 publicaciones mientras que para el 2017 hay 47 de un total de 504 resultados; las áreas relacionadas son: agricultura con un (52,5%), seguido de medicina con (25%), bioquímica con (15,8%), farmacología (11,9%), medio ambiente (9,7%), química (8,3%), otras áreas con un porcentaje menor, todo lo anterior demuestra ampliamente la relevancia del aguacate en diferentes sectores. En la **Tabla 3** se muestra un resumen de los diferentes usos que tiene la planta.

PARTE DE LA PLANTA	BENEFICIO	REFERENCIA
Árbol	Usados en sistemas agroforestales de café y cacao, sirve de sombra.	(Scheffer, et al, 2013)
Hojas	Alivio en la inflamación de diferentes órganos como estómago, hígado, matriz, ovarios y vientre, usado en el tratamiento de dolores asociados a enfermedades respiratorias.	(Vega, 2012)
Fruto	La pulpa se usa como mascarilla para la piel y el cabello, para promover el crecimiento de este último.	(Ranade et al, 2015)
Fruto	El extracto derivado del fruto se ha usado para el tratamiento de la piel, heridas, estrías	(Ranade et al, 2015)
Fruto	Aceite con usos industriales	(Eyres et al.,2001)
Fruto	Consumo en ensaladas y otros productos de uso culinario	(Lyle, 2006)

Tabla 3. Principales usos del aguacate

Como pasa con la mayoría de las especies vegetales, la importancia de los usos en medicina tradicional ha motivado investigaciones químicas en busca de determinar la composición química de interés y posteriormente validar mediante las pruebas de actividad

biológica Las acciones observadas. A continuación, se describen las características fitoquímicas de la especie *P. americana* combinadas con su actividad biológica.

2.1.5. Fitoquímica del aguacate

Se conoce que cualquier planta produce compuestos de naturaleza química, estos se pueden generar en diferentes orgánelos y/o tejidos celulares dependiendo de los estímulos y la etapa de crecimiento en la que se encuentre la planta (Sepúlveda et al, 2004). Dichas sustancias poseen diversas acciones biológicas entre las que se destacan: antifúngica, antibacterial, y antioxidante; los estudios relacionados con los compuestos producidos por las diferentes partes de la planta del aguacate, y las diversas acciones biológicas que estos presentan, han evidenciado un aumento significativo en los últimos 18 años, esto se muestra en la **Figura 6**, en la que se presentan los documentos reportados por año en la base de datos SCOPUS de acuerdo al motor de búsqueda “fitoquímica del aguacate”; para el año 2000 se registra 1 publicación mientras que para el 2017 se registran 6 resultados de un total de 52.

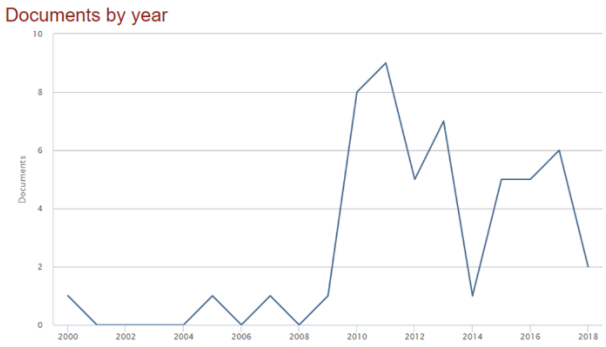
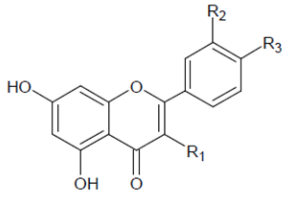


Figura 6. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: “fitoquímica del aguacate”. Tomado base de datos SCOPUS

A continuación, se muestran las propiedades fitoquímicas combinadas con la actividad biológica comprobada que poseen las diferentes partes del árbol del aguacate.

2.1.5.1. Fitoquímica de las hojas del aguacate

Se ha encontrado que las hojas de la planta de aguacate poseen acción antifúngica, insecticida y antioxidante, los extractos etanólicos de las hojas de *P. americana* demostraron actividad antioxidante en el ensayo de captación del radical DPPH, de este extracto se identificaron y caracterizaron cinco compuestos flavonoides, cuya estructura se muestra en la **Figura 7** (Owolabi et al, 2010). En otro estudio se demostró que los extractos metanólico y acetónico de hojas de aguacate poseen actividad antibacteriana y antifúngica demostrando una concentración mínima inhibitoria (MIC) en un rango entre 0,391 - 1,562 mg/mL, los tipos de metabolitos responsables de esta acción fueron saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides y terpenoides (Ajayi et al, 2017).



R_1=R_2=R_3=OH,
R_1=O-glucosa R_2=R_3=OH,
R_1=H; R_2=R_3=OH,
R_1=R_2=H; R_3=OH,
R_1=R_3=OH; R_2=OCH_3

Figura 7. Flavonoides aislados de las hojas *P. americana* (Owolabi et al, 2010)

2.1.5.2. Fitoquímica del fruto y la semilla del aguacate

Al igual que las hojas, la semilla y el fruto poseen compuestos responsables de diversas acciones benéficas para la salud dentro de las que se destacan la protección del hígado frente a diversas toxinas, la acción antiinflamatoria y anticancerígena (Arukwe et al, 2012). El fruto inmaduro del aguacate posee diversos compuestos con varias acciones, algunos ejemplos son las acetogeninas alifáticas que se ilustran en la **Figura 8**, estas mostraron inhibición en el crecimiento celular de diversas líneas cancerígenas (Ding et al, 2007). El compuesto (E,Z,Z)-1-Acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-eneicosa-5,12,15-trieno derivado de los extractos etanólicos, muestra acción antifúngica, inhibiendo la germinación de esporas del patógeno Colletotrichum gloeosporioides, (Domergue et al, 2000); el 1,2,4, trihidroxiheptadec-16-ino proveniente del extracto de diclorometano, presenta acción

insecticida frente a la larva del mosquito de la fiebre amarilla, En la **Figura 9** se presentan los compuestos con actividad antifúngica e insecticida descritos anteriormente. (Oberlies et al, 1998).

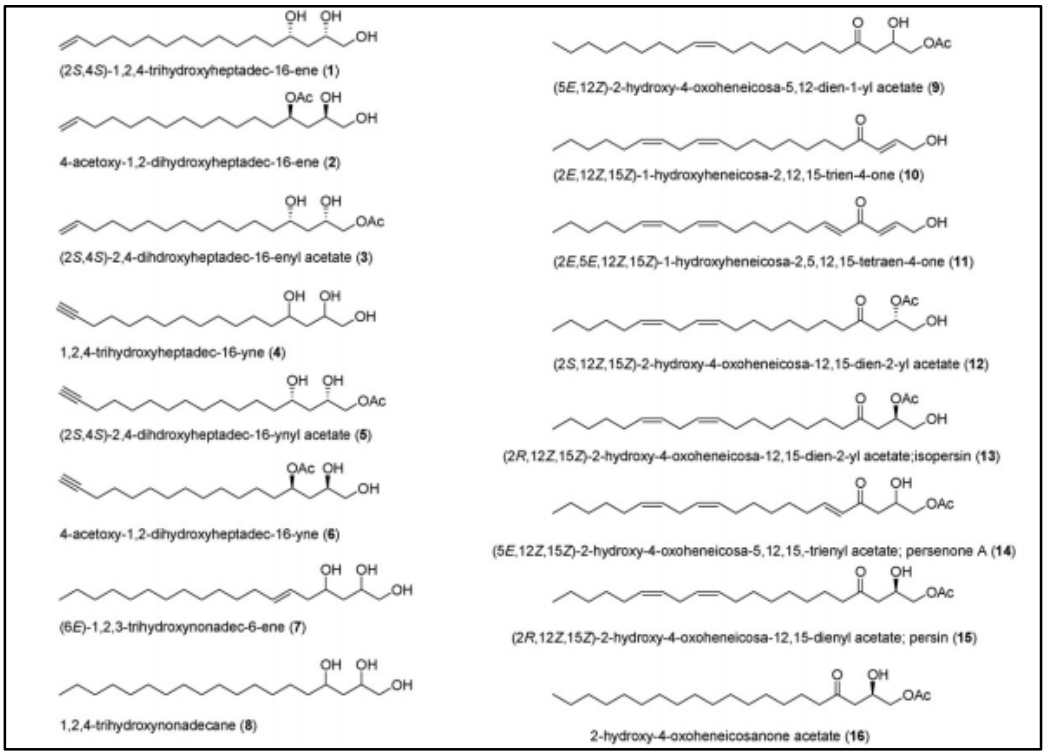
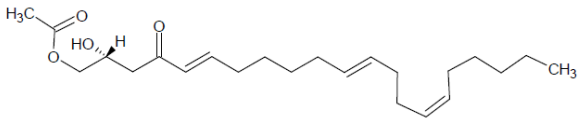
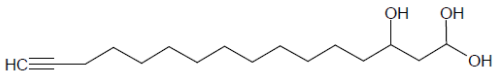


Figura 8. Metabolitos secundarios encontrados en el aguacate con acción anti-cancerígena y antiinflamatoria. (Ding et al, 2007)



(E, Z, Z) -1-Acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-5, 12,15-trieno aislado del fruto del aguacate inmaduro (Domergue *et al,* 2000)

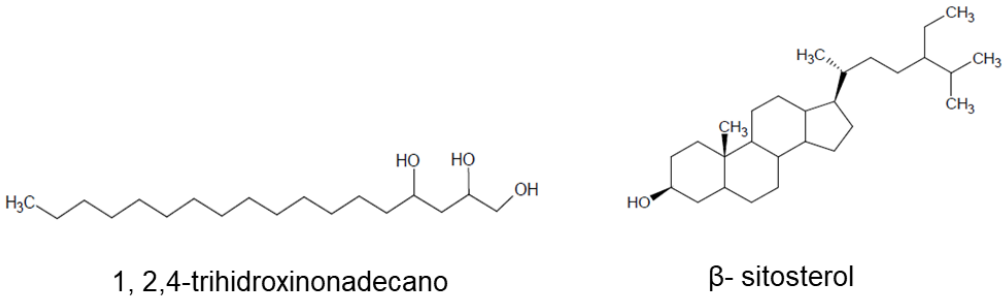


1, 2,4, trihidroxiheptadec-16-ino aislado del fruto del aguacate inmaduro. (Oberlies *et al,* 1998)

Figura 9. Metabolitos con actividad insecticida y antifúngica aislados del fruto de aguacate

En la semilla pueden variar los niveles y las concentraciones de los compuestos de acuerdo con el estado de madurez del fruto, dentro de los metabolitos secundarios encontrados en esta parte del aguacate se destacan los triterpenos, ácidos grasos, poli fenoles entre otros los cuales se ha comprobado que tienen propiedades antibacteriales,

antioxidantes, anti cancerígenas entre otras (Dabas et al, 2013), a estas propiedades se le suman otras como larvicida y antifúngica, los compuestos responsables de este tipo de acción son 1,2,4-trihidroxinonadecano y β- sitosterol (**Figura 10**), provenientes del extracto hexánico de semilla (Giffoni et al, 2009).



1, 2,4-trihidroxinonadecano β- sitosterol

Figura 10. Compuestos con actividad biológica aislados de la semilla de aguacate (Giffoni et al, 2009).

A continuación, en la **Figura 11** se muestra un resumen de las propiedades farmacológicas del aguacate, en él se evidencian la importancia del cultivo en términos de las aplicaciones que este tiene para el tratamiento de múltiples afecciones.

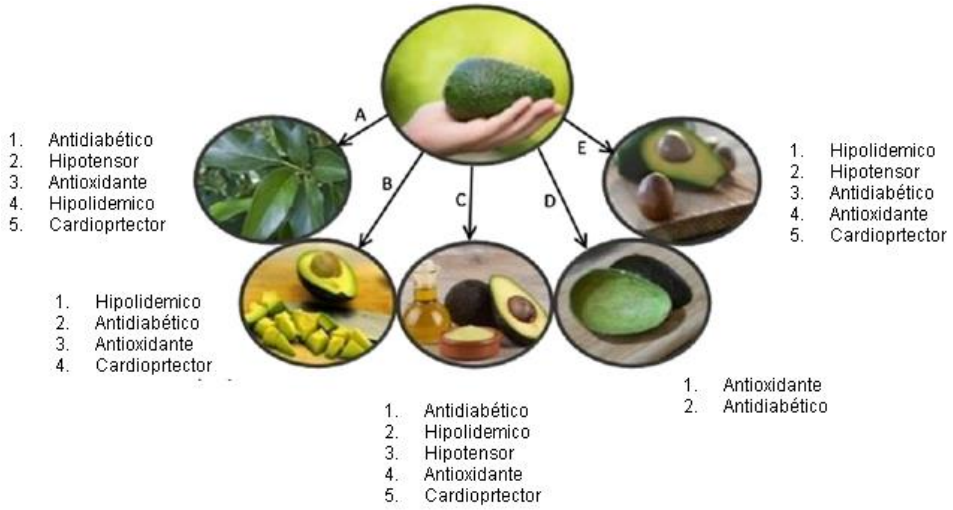


Figura 11. Acciones farmacológicas de diferentes partes del aguacate A: hojas B: hojas C: aceite D: cascara o endocarpio E: semilla (Tabeshpour et al, 2017)

El panorama anterior, hace evidente la importancia del cultivo del aguacate y de los compuestos que se han identificado en las diferentes partes del árbol, sin embargo, la

producción de estos compuestos se ve seriamente afectada, ya que la planta se encuentra expuesta a diversas dificultades, dentro de las que se destacan las de índole fitosanitario perjudicando, la calidad y propiedades de la especie botánica; a continuación, se describen los problemas fitosanitarios de la planta del aguacate.

2.1.6. Problemas fitosanitarios del cultivo de aguacate

El cultivo del aguacate a nivel mundial es afectado por diversos problemas fitosanitarios, estos dependen de los factores ambientales los cuales ayudan a la permanencia de la plaga dentro de la planta; de lo que se reporta hasta el momento para la especie P. americana se registran: 2 tipos de virus, 37 malezas, 1 tipo de bacteria, 16 tipos de hongos y 17 clases de insectos, a pesar del sin número de plagas reportadas para los cultivos de aguacate en el mundo, en Colombia los mayores reportes de pérdidas se atribuyen a las enfermedades causadas por hongos, a continuación se describen cuáles son los hongos fitopatógenos que se han reportado causantes de pérdidas en cultivos de aguacate en nuestro territorio.

El cultivo de aguacate en Colombia se ve afectado de manera significativa principalmente por 8 de estos microorganismos, dentro de los que afectan el fruto se encuentran: *Dothiorella Sacc, Fusarium sp., Sphaceloma perseae*, estos patógenos provocan pudrición en el fruto y roña como se evidencia en la **Figura 12a**, en la etapa de pos cosecha, la enfermedad se manifiesta con manchas de tonalidad marrón en la cascara (Manejo integrado de plagas. 2010), las pérdidas que se generan por las enfermedades ya descritas son alrededor del 10% por hectárea cultivada, la presencia de los hongos descritos es relevante en los departamentos de Caldas y Risaralda (Bernal et al, 2014).

Los patógenos que se han reportado por afectar la estructura del árbol son: *Cylindrocarpon destructans, Verticillium Nees, Amillaria mellea*, los cuales causan enfermedades como la marchitez vascular la cual se manifiesta en todo el espécimen vegetal, y se puede confundir con la pudrición de raíces, ya que las hojas del árbol presentan una tonalidad café, a pesar de que estas se mantienen por un tiempo, caen al igual que los frutos, el tallo presenta necrosis en estadios avanzados de la enfermedad (Ramírez, 2013) como se muestra en la **Figura 12b.** La llaga radical es una enfermedad que se presenta en la

terminación del tallo cerca de las raíces, su principal signo es la aparición de una mancha blanca como se muestra en la **Figura 12c** (Tamayo, 2007).

Figura12. Enfermedades de la planta de aguacate en Colombia causadas por diversos hongos fitopátogenos**. 12a.** Roña causada por el hongo *Sphaceloma perseae*. **12b.** Marchitez de raíces causada por el hongo *Cylindrocarpon destructans*. **12c.** Llaga radical causada por el hongo *A. mellea*

La pudrición de raíces o tristeza del aguacatero y la antracnosis en el fruto, son las dos enfermedades de más impacto en el territorio colombiano, con pérdidas superiores al 50% en cada caso, la pudrición es causada por *Phytophthora cinnamomi*, de manera general se presentan síntomas como: disminución del tamaño del fruto, un secamiento general del árbol, necrosis en la raíz principal y disminución en las raíces adventicias. Por su parte la antracnosis del fruto causada por *Colletotrichum gloeosporoides* se hace visible en la mayoría de los casos en la etapa de post cosecha, el síntoma más característico de la presencia de la enfermedad corresponde a manchas oscuras en la cáscara, en esta patología, el hongo puede estar dentro del fruto en la etapa de crecimiento, pero sus síntomas no se manifiestan sino hasta que el fruto este maduro. En la **Figura 13** se muestran los síntomas causados en las raíces y los frutos de aguacate por *Phytophthora cinnamomi y Colletotrichum gloeosporoides* respectivamente.

Figura 13. Pudrición de raíces causada por el hongo *Phytophthora cinnamomi*. Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporoides*.

Teniendo en cuenta que estos dos últimos hongos patógenos son los que afectan de manera significativa los cultivos de aguacate en el territorio colombiano, han sido de especial interés para la línea de investigación en Bioprospección de agentes fitosanitarios, del grupo de investigación en Estudio Químico y de actividad biológica de Rutáceas y Miristicaceas Colombianas, en donde hace cerca de 5 años se vienen adelantando investigaciones con el objeto de encontrar agentes de control de estos fitopatogenos a partir de especies botánicas, en el marco de diversos proyectos de investigación interdisciplinarios. Teniendo en cuenta nuestro interés como grupo de investigación y que tanto *Phytophthora cinnamomi*, como *Colletotrichum gloesporoides* generan la mayor cantidad de pérdidas en cultivos de aguacate de diferentes razas en el territorio colombiano, a continuación se realizará una descripción más completa de estos microrganismos.

2.1.6.1. Phythopthora cinnamomi

El origen de este fitopatógeno no es claro, no obstante, los primeros reportes muestran que proviene del continente asiático; a América latina llega posiblemente en el siglo XVIII, gracias al material vegetal transportado en los viajes de exploración español (Zentmeyer, 1988). Este oomicete tiene una gran afinidad con la familia de las Lauraceae especialmente con el género *Persea*, se caracteriza por ser un patógeno radicular que suele causar una podredumbre en las raíces finas y fibrosas (Hardman, 2005).

2.1.6.1.1. Características biológicas, condiciones de crecimiento, mecanismo de infección

Este oomicete puede crecer saprofíticamente en el suelo y persiste en el mismo o en el material vegetal infectado, cuando prevalecen las condiciones de crecimiento el patógeno empieza con el ciclo de esporulación asexual, tal como lo muestra la **Figura 14.** Las hifas somáticas que son esporangios multinucleados, se activan y liberan de 20 a 30 zoosporas uninucleadas biflageladas, las zoosporas sin pared nuclear forman los quistes amurallados, los cuales germinan y penetran por las raíces adventicias. En aproximadamente dos a tres días se convierte en huésped de la planta formando esporangios en la superficie de la misma, este hongo es reconocido por sobrevivir durante un tiempo de seis años bajo unas condiciones de suelo húmedo, lo cual es fundamental para el establecimiento, la extensión y la longevidad de *P. cinnamomi* (Dinis et.al., 2011).

La esporulación asexual para este oomicete requiere un ambiente húmedo, ya que favorece la formación de esporangios, la liberación y actividad de oosporas en el ambiente de crecimiento, estas zoosporas son los principales agentes infecciosos de *P. cinnamomi*. Por esto mismo la enfermedad en la planta se evidencia después de las épocas de lluvias constantes o fuertes (Hardman, 2005).

El proceso de infección de este patógeno en la planta se genera cuando se acaba la esporulación asexual, se forman quistes los cuales después de un tiempo aproximado de 30 min, se encriptan en el suelo y comienza a germinar el hongo, un tubo germinal emerge del zoospora e ingresa de forma ventral por la raíz comenzando, generando que el oomicete tome la misma como su hospedero. Después de dos o tres días posteriores a la infección se observan los síntomas en plantas que son susceptibles. La penetración de Phytophthora implica que durante el proceso de infección se de la producción y secreción de enzimas que digieren y degradan la pared celular subyacente de la planta, una de las consecuencias a nivel molecular de la acción enzimática es la degradación de la pectina presente en las paredes celulares radiculares. En la **Figura 14** se muestra el ciclo de vida de este oomicete

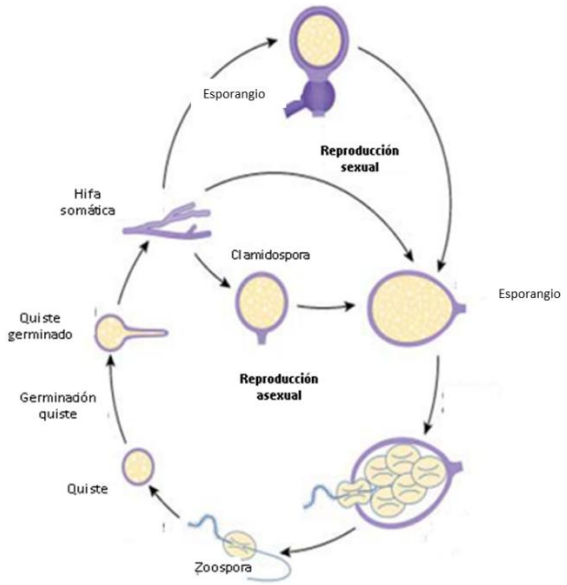


Figura 14. Diagrama del ciclo de vida del hongo *Phytophthora cinnamomi*. Tomado de Hardman. 2005

Ya que el mejor hospedero del *Phytophthora cinnamomi* son las raíces, el principal síntoma es la pudrición de las mismas seguido de la perdida de la tonalidad verde característica del follaje del árbol que en muchas ocasiones conduce a la muerte de la planta, ya que la pudrición de raíz no permite que los nutrientes del suelo ni el agua se distribuyan de manera uniforme a lo largo de la planta. Una vez diseminado el hongo en el suelo libera las zoosporas, las cuales comienzan con la reproducción asexual, gracias a condiciones de clima cálido y húmedo favoreciendo su rápida reproducción y propagación, no obstante, en climas extremos como fríos o sequía, este patógeno puede sobrevivir por la presencia de aguas de drenaje y al igual que en suelos muertos o secos por un tiempo prolongado. (Bernal et al., 2014)

La pudrición de raíces puede darse a temprana edad provocando debilidad y muerte en árboles jovenes. Los cultivos con ambientes húmedos son los más favorables, la presencia del oomicete causa, un cambio en el ciclo natural de la planta, la etapa de floración se presenta antes de tiempo, los brotes y frutos se pueden dar, pero son poco vigorosos y de menor tamaño, el secamiento general de las hojas es evidente en los primeros estadios de infección, algunos de los efectos que genera el hongo *Phytophthora cinnamomi* se muestran en la **Figura 15** (Nieto, 2012).

Figura 15. Principales síntomas de infección en el árbol del aguacate causada por Phytophthora cinnamomi **Figura 15a.** Necrosis del cuello de la planta. **Figura 15b.** Necrosis parcial de las raíces. **Figura 15c.** Secamiento general de las hojas. Imágenes tomadas de Nieto, 2012.

2.1.6.1.2. Pérdidas ocasionadas por infección del patógeno Phythopthora cinnamomi.

A pesar de que ningún estamento gubernamental maneja datos estadísticos continuos de pérdidas en cultivos de aguacate a causa de patógenos y de manera particular las generadas por *Phythopthora cinnamomi*; se conoce que a causa de este se pueden presentar perdidas entre un 30 y 50 % de los árboles en la etapa de vivero (Bernal et al., 2014).

El caso más representativo de pérdidas que se conoce en nuestro país se dio en la región caribe, en la zona conocida como Los Montes de María, ubicada entre los departamentos de Bolívar y Sucre, con una extensión aproximada de 3000 kilómetros cuadrados; en la que el cultivo de aguacate comprende cerca de 4100 hectáreas, abarcando principalmente los municipios de Carmen de Bolívar, San Jacinto y San Juan Nepomuceno. (Tofiño et al., 2012)

Para esta región se presentaron dos problemáticas de gran relevancia, la primera el conflicto armado del país, el cual afecto considerablemente esta zona, provocando desplazamiento de campesinos, que trajo como consecuencia el abandono de cultivos. La segunda problemática obedece a las malas prácticas agrícolas, que conllevaron a la generación de resistencia y dispersión de los patógenos *Phythopthora cinnamomi* y *Verticillium* sp, produciendo una disminución considerable en la producción de aguacate de raza antillana que es la variedad apta de acuerdo a las condiciones medio ambientales.

Según el banco de la republica la región caribe pasó de tener un 45% del total del área cultivada de aguacate en el país para 1992, frente a un 28% en 2010. (Vega 2012).

2.1.6.1.3. Métodos de control

Como ya se ha mencionado *Phytophthora cinnamomi* es uno de los patógenos que más afecta la planta del aguacate provocando grandes pérdidas, el análisis de los reportes obtenidos usando el motor de búsqueda: "control de *Phytophthora cinnamomi*" en la base de datos SCOPUS, muestra un total de 195 publicaciones, de las cuales en el año 2000 se tenían 14 estudios, y para el 2017 existen un total de 21 resultados, como se observa en la **Figura 16**, revelando que cada vez es más importante la investigación en los mecanismos de control de los efectos de este oomicete.

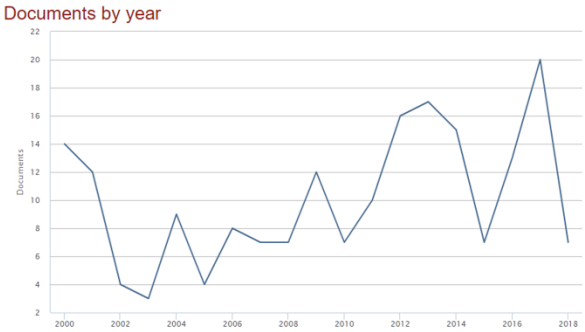


Figura 16. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "control de *Phytophthora cinnamomi*". Tomado base de datos SCOPUS

A continuación se describen los métodos de control que hasta el momento han sido eficaces en condiciones de campo y laboratorio.

- **Métodos de control culturales y químicos**

Los métodos de control que se aplican en campo son culturales y químicos, en el primer caso se implementan cuando no se tienen los estándares de calidad, los agricultores cuentan con el ICA (Instituto Colombiano de Agricultura) el cual provee de patrones e injertos que garantizan que los viveros de donde estos proceden posean estándares de sanidad. Ya que el hospedero del hongo se favorece con la humedad, se recomienda que los riegos sean moderados; los manejos preventivos se realizan por lo general en el proceso de sembrado o almácigo. En el estado de semillero y para el estado de germinación se deben usar sustratos inertes acompañados de soluciones fenólicas, las cuales garantizan que no se presenten ningún hospedero fitopatógeno (Nieto, 2012).

En algunas regiones para evitar la infección se incorpora materia orgánica a los suelos, ya que esto favorece el crecimiento de microorganismos antagónicos de patógenos (Nieto, 2012), sin embargo, una vez *P. cinnamomi* coloniza los cultivos se hace necesario el uso de compuestos de síntesis química, los cuales se seleccionan y utilizan de acuerdo la parte de la planta a tratar. Para realizar la propagación por semilla, estas se tratan con hipoclorito de calcio al 40% y luego con una combinación de dos carboximidas Carboxin y Captan.

Con el fin de prevenir la pudrición o la manifestación del hongo, durante la etapa de almácigo se debe seguir con el manejo de productos químicos en este caso se realizan dos aplicaciones de manera periódica de la combinación de dos fungicidas pertenecientes a los grupos acilalaninas y ditiocarbamatos Metalaxil y Mancozeb respectivamente. En el momento del trasplante al sitio definitivo de siembra se recomienda sumergir las raíces en los fungicidas ya mencionados para la prevención con la interacción con el suelo, a la vez el sitio de siembra también debe ser tratado con: Carbonato de Calcio + Azufre (Caldo Bordelés), o Hipoclorito de Sodio, o Yodo Agrícola, de esta manera se disminuye los riesgos de invasión de microorganismos, que hayan quedado cerca a causa de otros cultivos. (Bernal et al, 2014). En la **Figura 17** se muestran las estructuras químicas de los fungicidas utilizados en el control de *P. cinnamomi*.

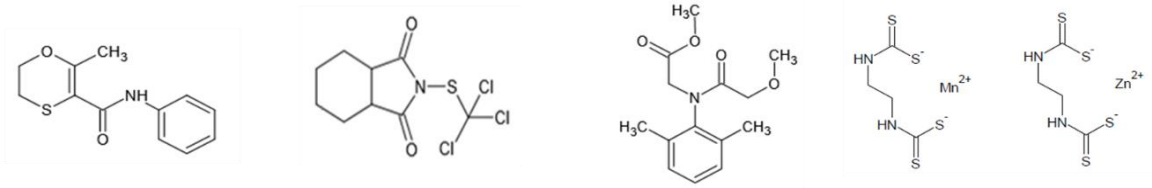


Figura 17. Estructuras químicas de los fungicidas utilizados para el control de Phytophthora cinnamomi

- **Métodos de control con elicitores**

Algunas investigaciones muestran que hay diversos mecanismos de defensa propios e inducidos para la planta, el uso de elicitores estimula una respuesta celular donde se activa la producción de compuestos naturales que defienden a la planta de los ataques de microorganismos fitopatógenos. Estos elicitores funcionan como moléculas señal, que activan los genes de defensa, algunas de estas moléculas pueden estar presentes en

hongos y bacterias saprofitas. Dentro de los elicitores más reconocidos se encuentran glicoproteínas, ácidos grasos, carbohidratos, y proteínas; su función principal es activar las vías de señalización, las cuales producen especies oxidativas (ROS), activan la biosíntesis de fitoalexinas, refuerzan la pared celular de la planta implicada, y promueven la síntesis de enzimas de defensa y proteínas relacionadas con la patogénesis, algunas de las cuales tienen propiedades antimicrobianas (Ebel, 1994).

Los trabajos con elicitores orientados a la búsqueda de control de *P. cinnamomi* se han desarrollado a nivel de laboratorio y a pesar de que no hay evidencias de estudios en campo cabe resaltar que son de gran relevancia para el control de la enfermedad a largo plazo, como lo muestra la investigación de Romero y colaboradores en el 2014, la cual resalta el uso de ácido araquidónico (AA), y ácido eicosapentaenoico (EPA) como elicitores, ya que se ha demostrado previamente que son potentes desencadenantes de células programadas para defensa y muerte en especies vegetales de la familia Solanácea.

Los investigadores tomaron muestras de raíces de *P. americana*, las cuales fueron sumergidas en soluciones de AA de diferentes concentraciones, usando como control agua; posteriormente se sumergieron en medio de cultivo liquido inoculado con *P. cinnamomi*. En las condiciones evaluadas se evidenció que la presencia del AA, provoca el aumento de la producción del 2,4-di-(1,1-dimetil-etil)-fenol en las raíces del aguacate, este fenol es uno de los compuestos responsables de la activación de rutas metabólicas en defensa por la presencia de *P. cinnamomi*, también se resalta que el uso de elicitores promueve la biosíntesis de metabolitos secundarios tipo fenólicos, algunas de los cuales son conocidos como fitoalexinas (Romero et al., 2014)

- **Control con productos de origen botánico**

A pesar de la efectividad de los métodos químicos, el uso de estos con lleva a varios problemas de índole ambiental y también pueden ser perjudiciales para la salud humana, es por esto que los productos naturales son una gran alternativa permitiendo que se mantenga la acción antifúngica, y que no se perjudique el nicho ecológico que rodea la planta. Hasta el momento no se han reportado metabolitos secundarios provenientes de especies botánicas, con acción antifúngica contra *P. cinnamomi*, sin embargo, hay varios estudios que demuestran la efectividad de los mismos para el control de especies del

género *Phytophthora,* las investigaciones existentes en este sentido se presentan a continuación.

Phytophthora drechsleri es una especie patógena en el pepino (*Cucumis sativus*), en la época de pos-cosecha, la combinación de los aceites esenciales de la canela (*Cinnamomum verum*) y de *Zataria multiflora* una especie vegetal típica de la India, reducen significativamente la presencia del hongo patógeno en el fruto, el estudio de la caracterización química de los aceites esenciales, mostraron una predominante presencia de: timol, γ-terpineno, carvacol, p-cimeno, y ß-cariofileno (Mohammadi et al. 2016). En la **Figura 18** se muestran las estructuras de los terpenos más abundantes en los aceites esenciales activos contra *P. drechsleri*.

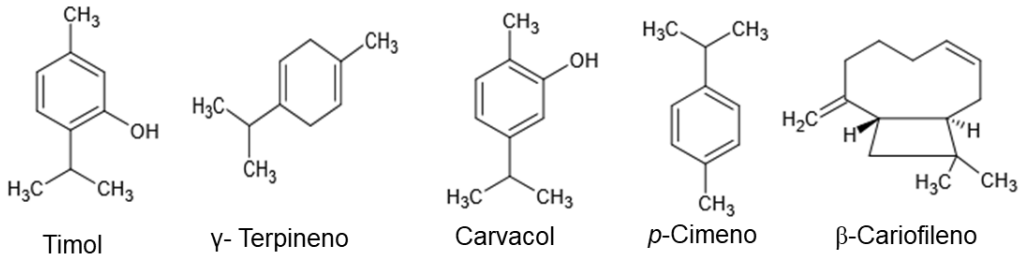


Figura 18. Estructuras químicas de los terpenos más abundantes en los aceites esenciales activos contra P. drechsleri

Estudios in vitro realizados en tres diferentes especies del género *Phytophthora: P. capsici, P. drechsleri, y P. melonis,* los cuales atacan pimienta, pepino y melón respectivamente, en los que se comparó la actividad de los agroquímicos típicos usados en el control de oomicetes patógenos (Mancozeb y Metalaxil), frente a la efectividad de aceites esenciales de las especies *Cymbopogon citratus* y *Ocimum basilicum*; mostraron que los aceites esenciales producían una inhibición de crecimiento del patógeno de un 40 y 70% respectivamente frente al 92% de inhibición de los agroquímicos. Un análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas permitió determinar la presencia de 42 compuestos químicos para el aceite de *Cymbopogon citratus* y 27 para el aceite de *Ocimum basilicum*; los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales fueron: α-citral, β-geraniol y Z-citral. Estos resultados muestran que, si bien los productos naturales no son igual de efectivos que los agroquímicos, si pueden llegar a ser una gran alternativa para el control de especies de *Phytophthora* si se considera que poseen una

menor toxicidad y se degradan con mayor facilidad (Amini et al, 2015). En la **Figura 19** se presentan las estructuras de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales ensayados.

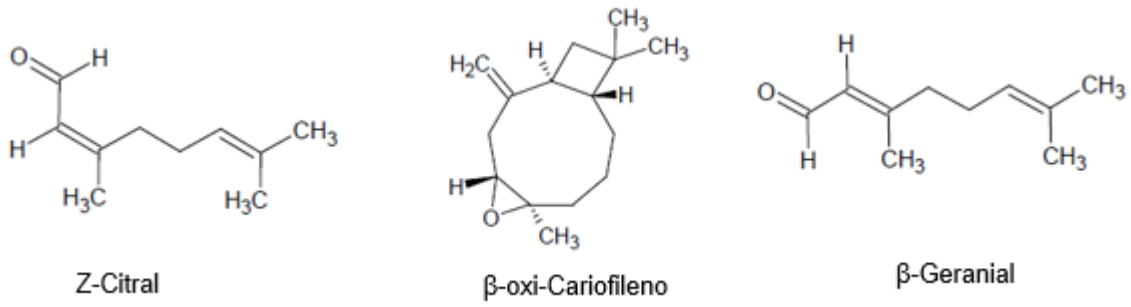


Figura 19. Estructuras químicas de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales ensayados frente a *P. capsici, P. drechsleri, y P. melonis*

2.1.6.2. *Colletotrichum gloeosporioides*

Las especies del genero *Colletotrichum* fueron reportadas por primera vez en 1790, como pertenecientes al género Vermicularia, sin embargo, en 1831 se determinaron como género *Colletotrichum*; el cual abarca diversas especies endófitas, epífitas, fitopatógenas, y patógenas. Este género tiene una gran relevancia y reconocimiento a nivel mundial por las enfermedades que provocan en numerosas especies botánicas de importancia comercial. (Hyde et al, 2009)

2.1.6.2.1. Características biológicas, condiciones de crecimiento, mecanismo de infección

Las condiciones óptimas del crecimiento y reproducción de *Colletotrichum gloesporioides* son una temperatura que oscila entre los 26 y 32 °C, y un porcentaje de humedad alto; el ciclo de vida de las especies del género *Colletotrichum* comprende dos fases una asexual y otra sexual; la propagación del hongo se da en la fase asexual (Rodríguez et al, 2013). Las esporas de las especies de este género presentan una forma ovalada, alargada y tamaño mediano como se pueden observar en la **Figura 20.**

Figura 20. Esporas de *Colletotrichum gloeosporioides*

El proceso de infección y desarrollo del hongo *C. gloesporoides* contempla las siguientes etapas (Rodríguez et, al. 2013).

1) deposición del hongo en la superficie del hospedante

2) fijación de la conidia (espora asexual) en la superficie,

3) germinación de la conidia,

4) producción del apresorio.

5) penetración de la epidermis de la planta

6) crecimiento y colonización del tejido del hospedante

7) producción de acérvulos (conjunto de conidióforos aceptados) y esporulación.

*Colletotrichum gloeosporioides***,** es uno de los hongos con mayor relevancia a nivel mundial, ya que afecta a unas 1000 especies de plantas, es su gran mayoría infecta frutos tropicales (Phoulivong et al., 2010).

Los signos de la infección de este hongo fitopatógeno en la planta de aguacate no son evidentes, solo hasta la maduración del fruto, los síntomas se evidencian como lesiones que se manifiestan en el endocarpio del fruto como se ve en la **Figura 21** y que se van extendiendo al mesocarpio. La antracnosis es más evidente en el proceso de pos cosecha, los frutos que desarrollan los síntomas de la enfermedad pueden sufrir maduración prematura (Nelson, 2008).

La presencia de este hongo fitopatógeno en el árbol se manifiesta en estadios jóvenes y brotes tiernos, en campo se presenta una coloración de café oscura a negra que, en condiciones de humedad relativa alta, provoca marchitez, muerte de hojas y el tallo se cubre de masas de color salmón, que corresponden a conidias del hongo que causa la enfermedad. (Tamayo. 2007)

Figura 21. Antracnosis en frutos de aguacate provocada por *Colletotrichum gloeosporioides.*

2.1.6.2.2. Pérdidas ocasionadas por infección de *C. gloesporoides*

A pesar de que no se encuentran informes de parte de estamentos gubernamentales, se conoce un estudio realizado con cultivares del departamento de Antioquia, en el cual se encontró que el 27% de un total de 1395 frutos de aguacate Hass tomados de 32 fincas productoras de este fruto mostraron daños internos característicos de la presencia del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, mientras tanto el 4,6% de las muestras presentaron síntomas externos con diferentes grados de severidad típicos de la presencia del patógeno. (Grisales et al, 2016)

2.1.6.2.3. Métodos de control

De manera tradicional, los agricultores usan la poda de partes infectadas del árbol, y en cultivos con mayor grado de tecnificación se aumentan las condiciones de luminosidad y aireación para evitar la prevalencia del patógeno (Tamayo, 2007); sin embargo, estos métodos no son suficientes, lo que hace que la investigación orientada a la generación de opciones de control de este patógenos siga siendo relevante. La búsqueda en la base de datos SCOPUS con el parámetro: “control de *Colletotrichum gloesporoides*”, muestra que existen 635 reportes, presentando un aumento significativo en los últimos años, para el

2000 se presentan 10 resultados, mientras que para el año pasado hay 75 publicaciones, como se observa en la **Figura 22.**

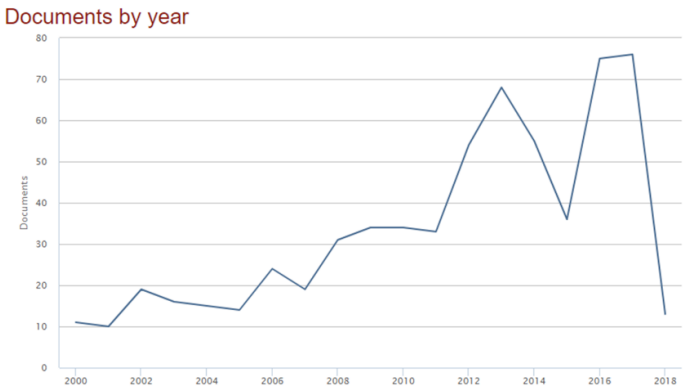


Figura 22. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda: "Control de Colletotrichum gloesporoides". Tomado de SCOPUS

Ya existen reportes de metabolitos secundarios aislados con acción antifúngica frente a este patógeno, todos los estudios son a nivel de laboratorio, y en muchos casos existen resultados prometedores, lo que hace pensar, que en las fuentes vegetales o en los microorganismos asociados que proporcionan metabolitos de defensa, existe un potencial importante de opciones que contribuyan al control de este hongo. A continuación, describen los métodos de control hasta ahora reportados.

- **Métodos de control químicos**

El manejo químico se hace desde la semilla antes de ser sembrada, se trata con hipoclorito de calcio al 40% por un tiempo corto y luego un manejo de seguido del manejo de Carboxin y Captan (**Figura 17**), lo que garantiza que el patógeno no infecte en la semilla. En el proceso de crecimiento de la planta, en condiciones de campo se debe hacer manejo con fungicidas basados en Oxicloruro de Cobre e Hidróxido Cúprico (Tamayo, 2007).

- **Métodos de control de origen botánico.**

Los compuestos que presentan acción antifúngica frente al patógeno *Colletotrichum gloeosporides*, provienen de diversas fuentes naturales, un ejemplo es la evaluación de 15 especies vegetales entre plantas medicinales y frutales como: guanábana (*Annona muricata*), melón amargo (*Momordica charantia*), Sambong (*Blumea balsamífera*), malabar melastome (*Melastoma malabathricum*), entre otras. En este estudio el extracto metanólico

de las especies ensayadas, generó inhibición de crecimiento micelial de este patógeno, el cual fue extraído de la cascara del mango (Johnny et, al. 2010).

Al igual en el caso de las especies del género *Phytophthora*, los aceites esenciales muestran una importante actividad antifúngica, 28 especies botánicas pertenecientes a las familias Asteraceae, Verbenaceae, Liliaceae, Boraginaceae, Cyperaceae, Poaceae Piperaceae y Lamiaceae, fueron ensayados frente al patógeno *Colletotrichum gloesporoides* en un ensayo de microdilución, el resultado del ensayo evidenció que el aceite esencial extraído de la especie *Cymbopogon citratus* (Poaceae) posee la menor concentración mínima inhibitoria. Los análisis de la composición química por CG-EM mostraron la presencia 25 compuestos dentro de los cuales se destaca la presencia de compuestos tipo sesquiterpenoides y monoterpenoides (Duarte et al., 2010). En la **Figura 23** de presentan las estructuras químicas de los compuestos más abundantes determinados en este estudio.

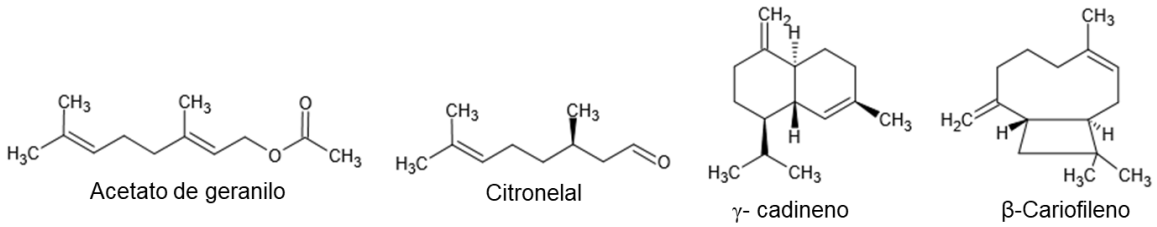


Figura 23. Estructuras químicas de los terpenos más abundantes en los aceites esenciales activos frente a Colletotrichum gloesporoides

En un estudio realizado en hojas de fresa (*Fragaria ananassa*), se determinó que aldehídos, alcoholes, y esteres, son los responsables de la inhibición del crecimiento micelial en los ensayos in vitro frente a la especie *Colletotrichum acutatum* (Arroyo et al., 2007). Las quinonas tipo 1,4-naftoquinonas, 1,4-benzoquinonas, y antraquinonas, extraídas de los pétalos de la flor oriental conocida como gromwell púrpura (*Lithospermum erythrorhizon*), fueron sometidas a screnning con tres especies del género *Colletorichum*, incluida *Colletotrichum gloesporides* mediante el ensayo de bioautografia directa, en el que se determinó que las antraquinonas, y las benzoquinonas son los núcleos estructurales que poseen mayor efecto antifúngico frente a los patógenos ensayados (Meazza et al., 2003). En la **Figura 24** se presentan las estructuras de las 1,4-benzoquinonas y antraquinonas activas

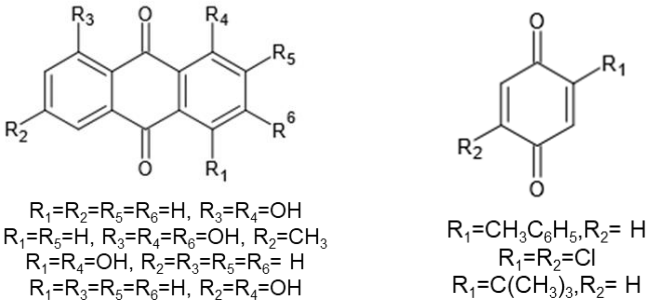


Figura 24. Quinonas activas aisladas de gromwell púrpura

El potencial de los compuestos derivados de las diversas especies vegetales que presentan acción antifúngica es amplio, ya que las plantas poseen un mecanismo de respuesta celular local donde se activa la producción de los metabolitos secundarios, bajo la presencia de un patógeno (Sepúlveda et al, 2003). Sin embargo, se ha encontrado que no solo la planta produce este tipo de compuestos, los microorganismos endófitos asociados a estas y con los que se presenta una relación simbiótica, también son productores de metabolitos de defensa (Nair et al., 2014). Muchos estudios han demostrado que los microorganismos asociados a la planta han desarrollado vías bioquímicas complejas como hormonas de crecimiento, producción de auxinas, abscicinas, giberelinas, y cinetinas; entre otros compuestos químicos que pueden contribuir a la protección de invasores como patógenos, insectos y / o animales de pastoreo. (Kharwar et, al. 2009).

Las investigaciones desarrolladas en la línea de bioprospección de agentes fitosanitarios, del grupo de investigación en Estudio Químico y de Actividad Biológica de Rutáceas y Miristicáceas Colombianas, la cual comenzó hace cerca de 12 años, orientada a la generación continua de alternativas de control de enfermedades fúngicas que generan pérdidas en el rendimiento y calidad de cultivos de interés comercial para nuestro país, nos han permitido determinar los géneros botánicos, las especies vegetales más promisorias como fuentes de productos naturales con actividad antifúngica, y numerosos compuestos activos, demostrando que las especies vegetales son una fuente muy importante de agentes que pueden ser usados para defensa vegetal en la agroindustria. Teniendo en cuenta nuestra experiencia y la literatura científica reciente, en la que se establece que los metabolitos presentes en las especies vegetales que tienen actividad en defensa, son en

muchos casos proporcionados por los microorganismos simbiontes de dichas especies; con el ánimo de ampliar nuestro horizonte de prospección de opciones efectivas de control de enfermedades fúngicas, a continuación se describirán los resultados de la revisión realizada alrededor de los microorganismos endófitos, su clasificación, características y acción biológica, dando relevancia al potencial de estos o sus derivados como antifúngicos usados en el control de fitopatogenos.

2.2. Microorganismos endófitos

Los reportes relacionados con el motor de búsqueda: “microorganismos endófitos” en la base de datos SCOPUS, suman un total de 1942 publicaciones en los últimos 18 años. Para el año 2000 se reportan 16 resultados, mientras que para el 2017 se tienen un total de 167, lo que demuestra el potencial del estudio de este tipo de fuentes naturales; las áreas temáticas en las que las investigaciones en torno a los estos son más relevantes son: la agricultura (54,1%), seguido de inmunología y microbiología (37,3%), bioquímica (35,6%), ciencias ambientales (21,3%), medicina (10%) y química (3,6%). En la **Figura 25** se presentan los documentos reportados por año y su análisis por área temática.

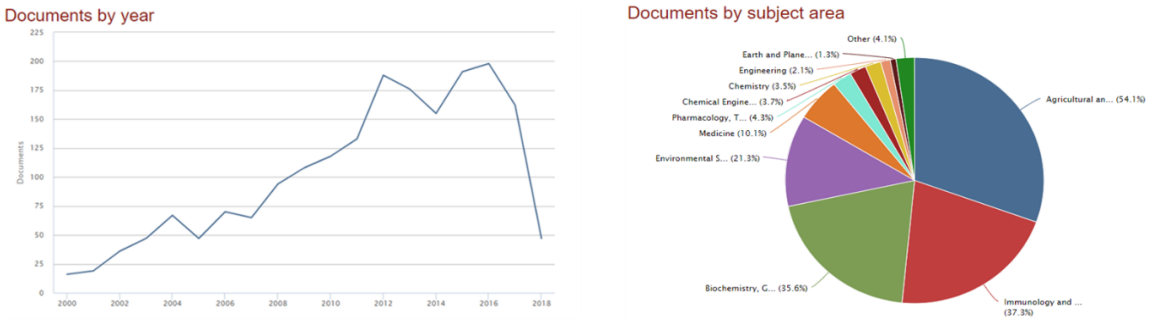


Figura 25. Documentos reportados por año 2000-2018 para el parámetro de búsqueda “microorganismos endófitos” y su análisis por área temática. Tomado base de datos SCOPUS

2.2.1. Clasificación de microorganismos endófitos

La definición biológica menciona que son organismos bacterianos o fúngicos, que colonizan en los tejidos sanos de manera inter o intra celular; estos usan diversos mecanismos para adaptarse de manera gradual a sus entornos, con el fin de mantener una relación simbiótica estable (Wilson 1995). A continuación, se hará la descripción

general de las características de las bacterias y se profundizará en los hongos endófitos, ya que son de interés particular para el nuestro grupo de investigación.

2.2.1.1. Bacterias endófitas

Las bacterias endófitas pueden desarrollar un papel benéfico, neutro o perjudicial dentro de la planta hospedera, esta acción depende de ciertas condiciones ambientales. Dentro de las especies vegetales en las que comúnmente se encuentran las bacterias endófitas estan: arboles leñosos, y plantas herbáceas; cabe resaltar que pueden coexistir más de una bacteria. Los estudios realizados por Gardner y colaboradores en 1982 permitieron el reconocimiento de estos microorganismos en la xilema de la planta de limón (Lodewyckx et al. 2002), algunos ejemplos de bacterias endófitas encontradas en diversas plantas se evidencian en la **Tabla 4.**

Planta	**Bacteria endófita**
Fresa (*Fragaria ananassa*)	*Pseudmona flourescens, Pseudmona corrugata, Pseudmona tolaassi, Pseudmona paucimbilis Xanthomonas* ssp.
Plantas cítricas	*Alcaligenes sp., Bacillus cereus, B. lentus, B pumilus, B, magaterium, B subtilis, Burkhlderia cepacia, methylbacterium extroquenes, Pantoea agglomerans.*
Limón áspero (*Citrus limón*)	*Pseudomonas sp., Bacillus sp., Enterobacter sp. Corynecbaterium sp, Lactobacillus sp., Seratia sp*.
Maíz (*Zea mays*)	*Pseudomonas sp., Bacillus sp., Corynecbaterium sp., Enterobacter sp*
Canola (*Brassica napus*)	*Flavobacterium sp., Micrococcus sp., Bacillus sp., Rathayibacter sp.*

Tabla 4. Bacterias endófitas presentes en algunas plantas. (Lodewyckx et al. 2002)

Dentro de los beneficios que se han encontrado de las bacterias endófitas se resaltan, que promueven el crecimiento de la planta, ayudan a la absorción de nutrientes del suelo y a la fijación de nitrógeno atmosférico (Sturtz 1995). Al mismo tiempo la presencia de estos microorganismos en el suelo también lleva consigo beneficios para la planta, como minimizar los efectos de diversos organismos fitopatógenos; un ejemplo son las bacterias endófitas encontradas en la cascarilla de la semilla de arroz, las cuales logran minimizar el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum*, *Gaeumannomyces graminis* y *Heterobasidium annosum*; teniendo en cuenta que frecuentemente en las prácticas agrícolas la cascarilla de arroz se mezcla con el suelo antes de la siembra, la presencia de bacterias con actividad antifungica en la cascarilla de arroz generan un beneficio indirecto para la planta (Mukhopadhyay et al.1996).

Algunos de los compuestos que producen las bacterias endófitas son: terpenoides, alcaloides, fenoles, al igual que fitohormonas las cuales juegan un papel de coordinación, control y desarrollo dentro de la planta; la interacción entre las bacterias y su hospedante vegetal, conlleva a la producción y la modulación de hormonas vegetales; la producción de estos compuestos se da de acuerdo a la necesidad en la etapa de crecimiento de la planta (Singh et al, 2017).

2.2.1.2. Hongos endófitos

La base de datos SCOPUS muestra para el parámetro de búsqueda: “hongos endófitos” un total de 5016 resultados, para el año 2000 se reportan 76 documentos, para el 2017 las publicaciones aumentaron a 512; esto demuestra la gran importancia de las investigaciones de este tipo de organismos. Las áreas temáticas dentro de las que se enmarcan la mayoría de los estudios son: agricultura (60,2%), bioquímica (36,6%), inmunología y microbiología (20%), ciencias ambientales (16,7%), medicina (14,9%) y química con un (8,7%). Las estadísticas hacen pensar que el estudio químico de esta fuente natural aún es reducido, evidenciando el potencial de encontrar metabolitos activos nuevos o novedosos en este tipo de microorganismos. En la **Figura 26** se presentan los documentos por año y su análisis por área temática.

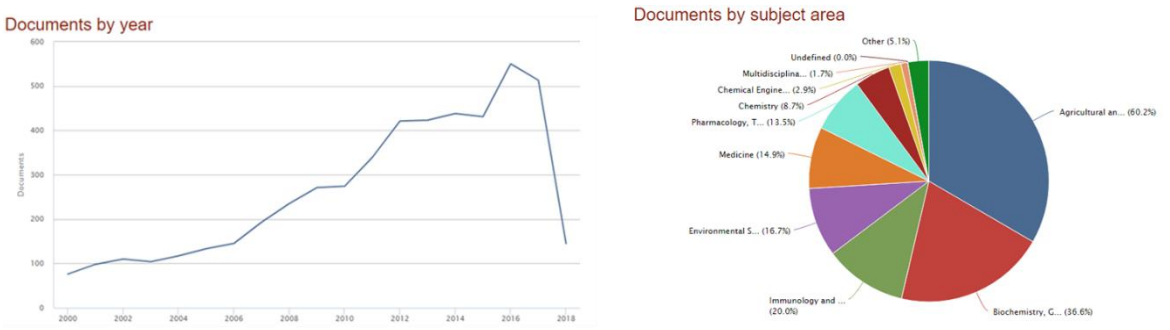


Figura 26. Documentos reportados por año 2000-2018, para el parámetro de búsqueda "hongos endófitos y su análisis por área temática". Tomado base de datos SCOPUS

A continuación, se muestra los aspectos más importantes de los hongos endófitos, haciendo énfasis en los compuestos que producen estos microorganismos, y resaltando la acción antifúngica.

Los hongos endófitos se definen como microorganismos que en su mayor parte de ciclo de vida colonizan los tejidos de la planta hospedera, sin causar un daño evidente o ningún daño. Pueden encontrarse en especies como: pastos, algas, musgos, y plantas vasculares; la temperatura en la cual sobrevive e interactúa el microorganismo con la planta es variada ya que, puede abarcar un rango amplio lo que deriva en que pueden estar presentes en diferentes ambientes y pisos térmicos.

El reconocimiento de estos microorganismos se da en el año 1898, investigadores de la época, formularon hipótesis de la existencia de estos, pero no fue sino hasta 1977 que Bacon le dio la continuidad a las hipótesis ya mencionadas, de ese tiempo hasta la actualidad se han empezado a reconocer, a clasificar y a estudiar la importancia que estos organismos tienen (Sánchez et al, 2013)

La clasificación de los hongos endófitos es muy diversa, ya que, estos microrganismos poseen más de un sitio hospedero en la planta, diversos estudios se han realizado al respecto, para finalmente dividirlos en dos grupos: Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos. El primer grupo hace referencia a microorganismos causantes de síndromes tóxicos en herbívoros que consumen la planta hospedante; estos están presentes en el tallo y los rizomas, ayudan a la tolerancia de factores de sequía que afectan la planta.

El grupo no Clavicipitáceos son los hongos endófitos presentes en diferentes partes de la planta, le confieren tolerancia a estrés biótico y abiótico, son los encargados de la producción de metabolitos secundarios, incrementando la protección a la misma frente a patógenos, y otros factores externos que la perjudican. Una de las últimas clasificaciones de los hongos endófitos se muestra a continuación en la **Tabla 5** (Rodríguez et, al. 2009).

CRITERIO	**Clavicipitáceos**	**No Clavicipitáceos**		
	CLASE 1	**CLASE 2**	**CLASE 3**	**CLASE 4**
Rango de hospederos	Reducido	Extenso	Extenso	Extenso
Tejidos que colonizan	Tallo y rizomas	Tallos, hojas y rizomas	Tallos, hojas, corteza, flores y frutos	Raíces
Trasmisión	Vertical y horizontal	Vertical y horizontal	Horizontal	Horizontal
Función ecológica	Incrementa la biomasa de la planta. Confieren tolerancia a la sequía. Produce metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros	Incrementa la biomasa de la planta. Confiere tolerancia al estrés abiótico. Protegen contra hongos patógenos por acción de metabolitos secundarios.	Induce resistencia a las enfermedades. Protección contra los herbívoros y modifican la sensibilidad al estrés abiótico mediante la producción de metabolitos secundarios	Inhiben el crecimiento de patógenos y producen metabolitos secundarios tóxicos para los herbívoros.

Tabla 5. Grupos y clases de hongos endófitos. Clasificación según Rodríguez y colaboradores. 2009

Los hongos endófitos podrían llegar a ser patógenos, las condiciones para que está patogenicidad se presente, son extremas para la planta como por ejemplo, el secamiento total o poca absorción de nutrientes; lo cual provoca que se acabe la relación de mutualismo. Muy poco se sabe sobre la interacción de estos con el huésped, ya que las investigaciones se han enfocado en determinar la actividad biológica que presentan estos compuestos químicos producidos por los microorganismos. (Schulz et al, 1999)

2.2.1.2.1. Características biológicas principales de los hongos endófitos

Son microorganismos eucariotas pertenecientes al reino Fungi, a diferencia de las plantas estos poseen pared celular compuesta por quitina, no tienen cloroplastos esto indica que son heterótrofos (incapaces de producir su propio alimento), su reproducción puede ser sexual o asexual esto depende a la morfología macro y microscópica, presentan esporas asexuales (conidios) y sexuales (ascoporas). Cada hongo endófito presenta su propio ciclo de reproducción las **Figuras 27 y 28** muestran el tipo de reproducción de los hongos de los phylum Basidiomycota y Ascomycota, grupos biológicos a los que pertenecen diversos hongos endófitos (Galdamez.et.al.1988)

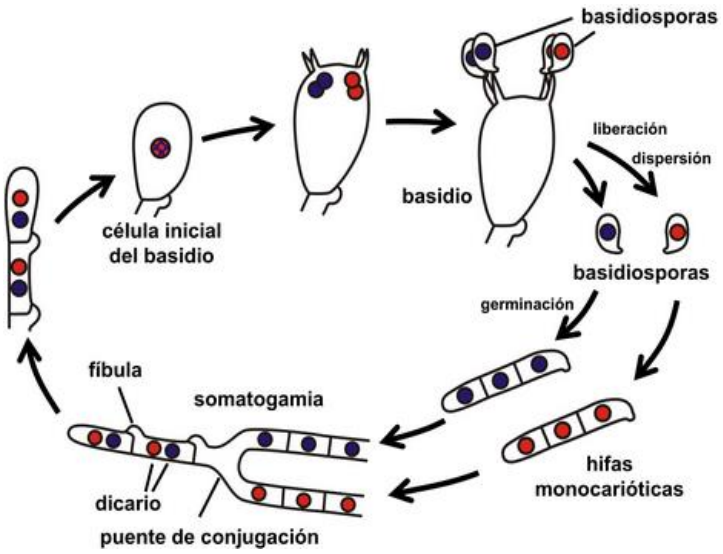


Figura 27. Ciclo de vida de Basidiomycota. Tomado de http://www.taxateca.com.

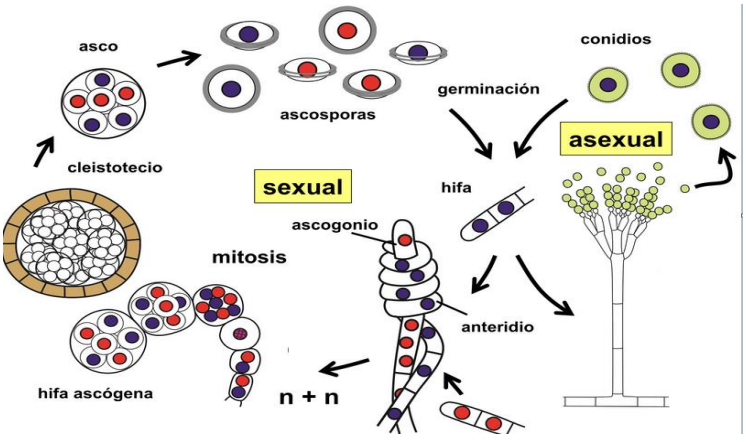
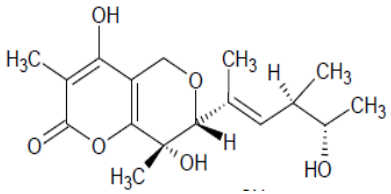
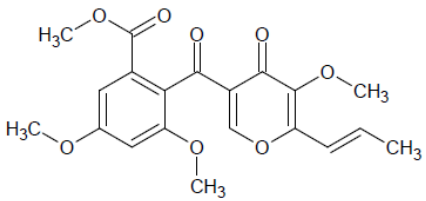


Figura 28. Ciclo de vida de Ascomycota. Tomado de http://www.taxateca.com.

2.2.1.2.2. Metabolitos secundarios producidos por hongos endófitos y sus acciones biológicas

Los hongos endófitos producen una cantidad significativa y variada de metabolitos secundarios, con diversas actividades biológicas, entre las que se resaltan: anticancerígena, antibacterial, insecticida, y antifúngica; cabe resaltar que la cantidad y los tipos de compuestos dependen de la especie endófita y los factores ambientales que la influencian (Wang et al. 2007). Teniendo en cuenta el interés de la presente revisión, en la **Tabla 6** presentaremos un ejemplo de acción biológica encontrada en compuestos aislados de hongos endófitos diferente a la acción antifungica.

FUENTE VEGETAL	MICROORGANISMO	EXTRACTO	COMPUESTOS AISLADOS	ACTIVIDAD	REFERENCIA
Garcinia preussi	*Aspergillus japonicus*	Acetato de etilo		Antibacterial	Jouda et, al.2017
Alborocera (*Arbutus unedo*)	*Talaromyces pinophilus*	Acetato de etilo		Insecticida	Vinale et, al.2017

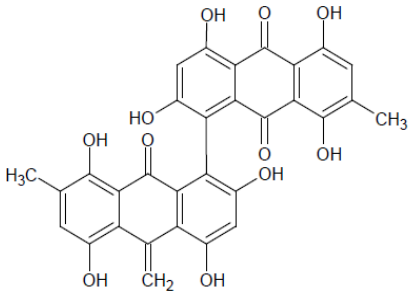
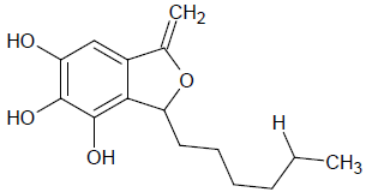
FUENTE VEGETAL	MICROORGANISMO	EXTRACTO	COMPUESTOS AISLADOS	ACTIVIDAD	REFERENCIA
Cebollin (*Allium schoenoprasum*)	*Penicillium pinophilum*	Acetato de etilo		Anticancerigena	Koul et, al.2016
Tangare (*Xylocarpus granatum*)	*Phomopsis sp.*	Etanólico		Antipalúdica	Kornsakulkarn et, al.2015

Tabla 6. Acción biológica encontrada en compuestos aislados en hongos endófitos.

Considerando que el interés de esta revisión es determinar el potencial de los hongos endófitos como fuente de compuestos con actividad antifungica orientada al control de enfermedades en plantas, a continuación, se realizará una descripción detallada de lo referente a los reportes encontrados en este sentido.

2.2.1.2.3. Hongos endófitos con actividad antifúngica o con potencial en defensa vegetal.

El protagonismo de los hongos endófitos en la biología es de gran relevancia, dada que la interacción entre estos microorganismos y sus antagonistas son mediadas por interacciones químicas las cuales cumplen un propósito. Estas interacciones y la producción de compuestos químicos por parte de estos hongos son fuente de investigaciones y estudios (Strobel et al, 2003). Los estudios hasta el momento encontrados al respecto se pueden evidenciar en la **Tabla 7**

Los hongos que se encargan de producir metabolitos secundarios y proveer protección a la planta frente a hospederos patógenos son los endófitos no clavicipitáceos, en la **Figura 29** se presenta un esquema de la relación entre el patógeno, la planta, y el endófito, donde el hongo patógeno y endófito muestran una competencia por la colonización de la planta; en esta relación se ven involucrados los metabolitos secundarios y es por esto que las especies endófitas tienen una gran relevancia a nivel ecológico. (Prado et al, 2012)

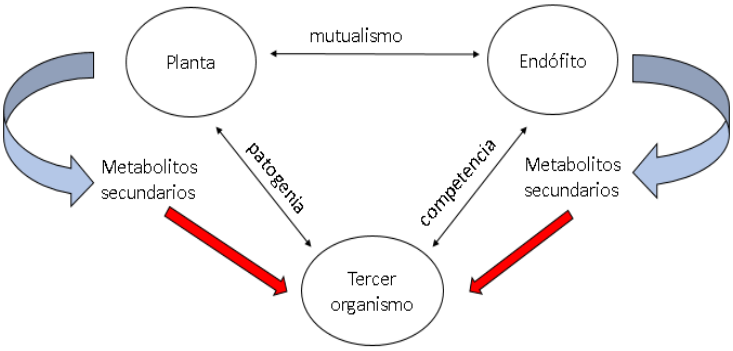


Figura 29. Representación de una relación tripartita entre una planta, su comunidad endófita, y un tercer organismo, por ejemplo, un hongo patógeno. Tomado de Prado et al, 2012

FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Alcanforero (*Cinamonum camphora*)	*Paraconiothyrium brasiliens*	Acetato de etilo del micelio	NR	Difusión en agar-EC_{50}	0.439 mg/mL contra *Alternaria solani* 0.342 mg/mL contra *Phytophthora capsici*	Han et al, 2012
Ciprés (*Cupressus sempervirens*)	*Phoma herbarum*	Metanólico del micelio	NR	Difusión en agar-% de inhibición de crecimiento. A 250 µM	71% contra *Pyricularia oryzae* 9,3% contra *Diplodia seriata* 9,6% contra *Phaeobotryon cupressi*	Soltani et al, 2014.

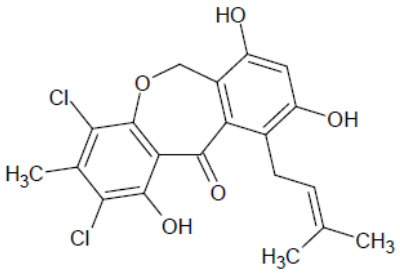
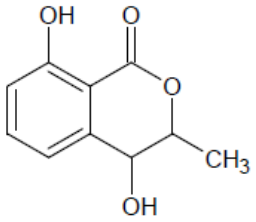
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Alerce europeo (*Larix decidua*)	*Microsphaeropsis* sp	Acetato de etilo del micelio	NR	Difusión en agar – radio de inhibición	15 mm contra *Phytophthora infestans* 10 mm contra *Botrytis cinerea* 8 mm contra *Septoria tritici* 7 mm contra *Microbotryum violaceum*	Dai et al, 2015
Pera oriental espinosa (*Opuntia humifusa*)	*Alternaria* sp.	Extracto en DCM de micelio liofilizado	NR	Bioautografia directa-Inhibición de crecimiento	9mm contra *Colletrotrichum gloeosporioides* 8mm contra *Colletrotichum fragaire* y 8mm contra *Colletrotichum acutatum*	Silva-Hughes et al, 2015

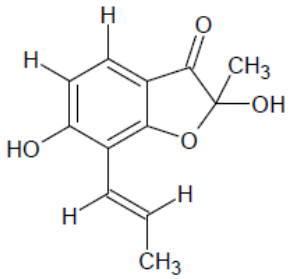
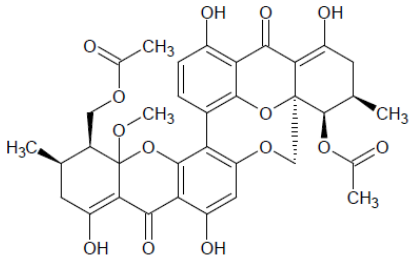
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Hojas de corazón (*Houttuynia cordata*)	*Chaetomium globosum*	Acetato de etilo del sobrenadante	NR	Difusión en agar-% inhibición de crecimiento a 10% v/v de extracto	68.49% contra *Botrytis cinerea* 59.06% contra *Alternaría solani* 67.44% contra *Phythopthora capsici* 64.90% contra *Fusarium oxysporun f. sp. nieveum* 61,68% contra *Sclerotinia sclerotiorum* 59.66% contra *Exserohilum turcicum*	Pan et al, 2016

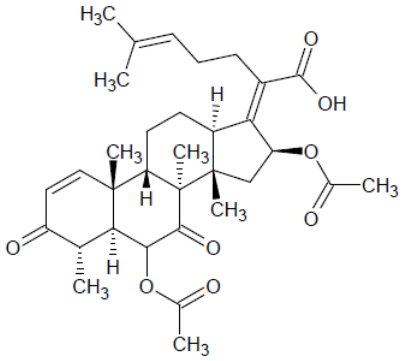
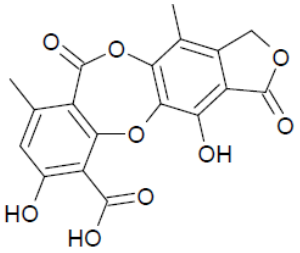
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Hojas de corazón (*Houttuynia cordata*)	*Chaetomium globosum*	Acetato de etilo del sobrenadante	NR	Difusión en agar-% inhibición de crecimiento a 10% v/v de extracto	86,18 % contra *Puccinia zoysiae* 59.41% contra *Fusarium moniliforme* 69.51% contra *Alternaria alternata* 100% contra. *Alternaria solani* 45.9 % contra *Thielaviopsis basicola* 100% contra *Bipolaris maydis* 100% contra *Aphanomyces raphani*	Pan et al, 2016

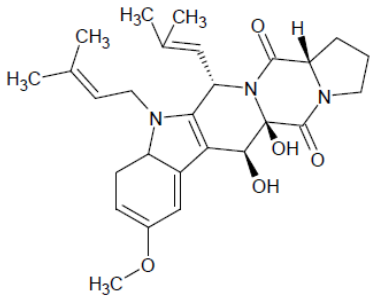
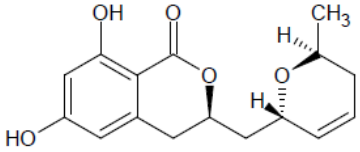
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Plama botella (*Mascarena lagencuulis*)	*Fusarium falciforme*	Hexánico, Acetato de etilo, y Metanólico del micelio	NR	Difusión en agar- EC_{50}	1054.88 ppm, 262.01 ppm, y 161.14 ppm respectivamente contra *Colletotrichum coffeanum*	Song et al, 2016
Katuka (*Picrorhiza kurroa*)	*Phomopsis/Diaporthe sp.*	Fracción de compuestos volátiles extraída por Head space del micelio	VOCs	Ensayo de actividad fumigante- % inhibición de crecimiento	34.6 % contra *Fusarium oxysporum* 16.6 % contra *Fusarium solani*	Qadri et al, 2015

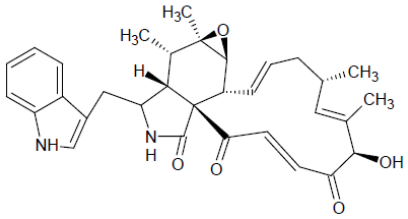
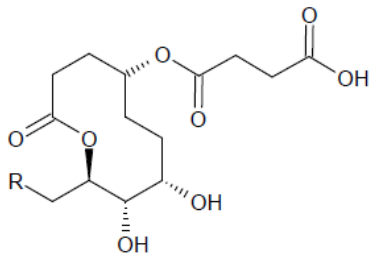
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Cuajiote blanco (*Bursera lancifolia*)	*Hypoxylon anthochroum*	NA	VOCs	Actividad fumigante por confrontación directa -% inhibición de crecimiento	21.6% contra *Alternaría solani*	Ulloa et al, 2016
Azulillo (*Haematoxylon brasiletto*)	*Xylaria sp*	NA	VOCs	Actividad fumigante por confrontación directa -% inhibición de crecimiento a 250 µM	78,3% contra *Phytophthora capsici* 48,3% contra *Alternaria Solani* 24.5% contra *Fusarium oxysporum*	Sanchez et al, 2016

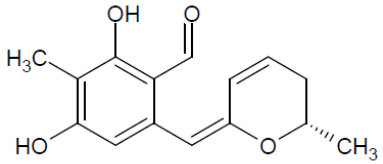
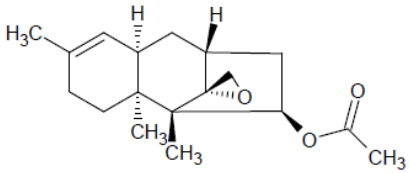
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Tallo de árbol no identificado presente en provincia Hainan de la República China	*Pestalotiopsis adusta*	Acetato de etilo del micelio	 Pestalacloruro A	Microdilución IC_{50}-MIC	4.7 µM - 49.0 µM contra *Fusarium culmorum* 1.1µM -12.2 µM contra *Gibberella zeae* 7.9 µM -12.2 µM contra *Verticillium aiboatrum.*	Li et al, 2008
Mico de noche (*Alibertia macrophylla*)	*Penicillium sp.*	Acetato de etilo del micelio	 5-hidroximetilina	Bioautografía directa-MIC	10 µM contra *Cladosporium sphaerospermum*	Oliveira et al, 2009

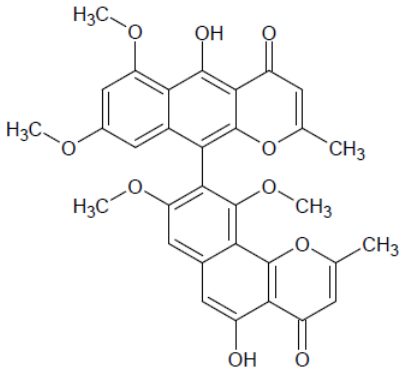
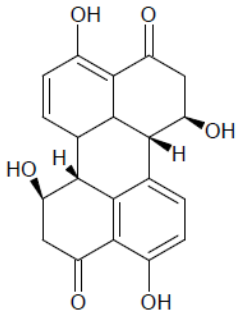
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Raíz de Rehmannia fresca (*Rehmannia glutinosa*)	*Verticillium sp.*	Acetato de etilo del sobrenadante	 2,6-dihidroxi-2-metil-7-(prop-1E-enil-) bezofuran -3 (2H)-ona	Confrontación directa por FEL -MMDC	125 µM contra *Pyricularia oryzae*	You et al, 2009
Costus sp	*Phomopsis sp.*	Acetato de etilo del micelio	 Pomoxantona A	Screening de protección de cultivos - % de crecimiento del hongo a 125 ppm	0% de crecimiento del hongo *Pyricularia oryzae*	Deshmukh et al, 2012.

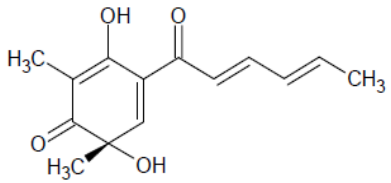
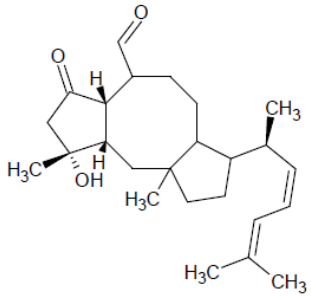
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Árbol del paraíso (*Melia azedarach*)	*Aspergillus fumigatus*	Metanólico del sobrenadante	 Ácido helvólico	Bioautografia directa -MIC	50 µM contra *Fusarium solani* 12.5 µM contra. *Alternaria solani* 6.25 µM contra *Botrytis cinerea, Colletotrichum gloeosporioides, y Fusarium oxysporum*	Li et al, 2012.
Stylogyne turbacensis	*Cordyceps dipterigena*	Extracto crudo	 Cordicepsidona b	Difusión en agar- MIC	50 µM contra *Giberella fujikuroi*	Varughese et al, 2012

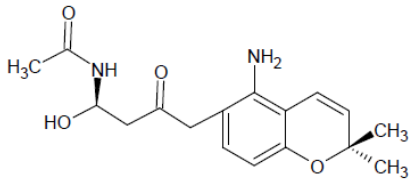
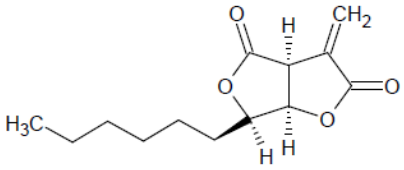
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Árbol de la gutapercha (*Eucommia ulmoides*)	*Fusarium sp*	Acetato de etilo del micelio	 Fumitremorgin A	NR-MIC	50 µM contra *Alternaria solani*	Ma et al, 2012
NR	*Cladosporium cladosporioides*	Acetato de etilo del micelio	 Cladosporina	Microdilución-% inhibición de crecimiento a 30 µM	92.7% contra *Colletotrichum acutatum* 90.1% *Colletotrichum fragariae* 95.4% contra *Colletotrichum gloeosporioides* 79.9% contra *Phomopsis vitícola*	Wang et al, 2013.

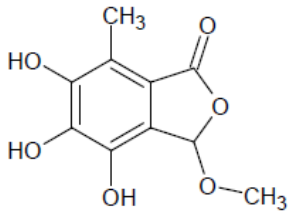
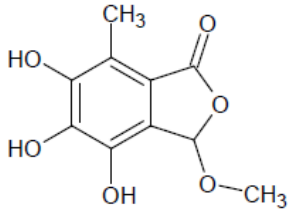
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Ginkgo biloba	*Chaetomium globosum*	Acetato de etilo del micelio	 Chaetoglobosina A	Difusión en agar – MIC, EC_{50}	0.0150 µM, 0.1073 µM contra *Coniothyrium Diplodiella* 0.0625 µM, 0.6663 µM contra *Rhizopus stolonifer*	Zhang et al, 2013
Diversas plantas del Ecuador	*Xylaria feejeensis*	Diclorometano del sobrenadante	 R= n- C_6H_{13} Xiolida	Difusión en disco-MIC	425 µM contra *Pythium ultimum*	Baraban et al, 2013

FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Ginseng (*Panax ginseng*)	*Penicillium melinii*	Acetato de etilo del micelio	 Ginsenocina	Bioautografia directa - MIC	125 µM contra *Pyricularia oryzae*	Zheng et al, 2013.
Ajo (*Allium sativum*)	*Trichoderma brevicompactum*	Acetato de etilo del micelio	 Tricodermin	Difusión en agar- EC_{50}	0.25 µM contra *Rhizoctonia solani* 2.02 µM contra *Botrytis cinérea* 25.60 µM contra *Colletotrichum lindemuthianum*	Shentu et al, 2014

FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Árbol del paraíso (*Melia azedarach*)	*Aspergillus* sp	Acetato de etilo del sobrenadante	 Fonsecinona A	NR - MIC	50 µM contra *Gibberella saubinetti*	Xiao et al, 2014.
Árbol del paraíso (*Melia azedarach*)	*Botryosphaeria dothidea*	Metanólico del micelio	 Estemfiperilenol	Microdilución-MIC	1,57 µM contra *Alternaria solani*	Xiao et al, 2015

FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Cacao (*Theobroma cacao*)	*Trichoderma harzianum*	Extracto de acetato de etilo de la zona de interacción	 Sorbicillinol	Confrontación directa-inhibición de crecimiento	Inhibición de crecimiento *Moniliophthora roreri*	Tata et al, 2015
Tapekue (*Acanthospermum australe)*	*Aspergillus calidoustus*	Extracto crudo del micelio	 Opiobioin K	NR-% de inhibición de crecimiento micelial a 150 µM	81.9% contra *Colletotrichum acutatum* 84.5% contra *Colletotrichum gloeosporioides* 79,9% contra *Fusarium oxysporum*	Rodrigues de Carvalho et al, 2015

FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Miraña (*Piper guinensis*)	*Fusarium sp.*	Acetato de etilo del micelio	 Bancromeno	Ensayo inhibición de movimiento de zoosporas-LC_{50}	20 µM contra *Plasmopara viticola*	Kongue et al, 2015
Ginkgo biloba	*Nodulisporium sp*	Acetato de etilo del micelio	 Esporotriolida	Difusión en agar-EC_{50}	11.6 µM contra *Rhizoctonia solani*	Cao et al, 2016

FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Panax notoginseng	*Chaetomium globosum*	Acetato de etilo del micelio	 Epicocona	NR-MIC	512 µM contra *Cladosporium oxysporum*	Li et al, 2016
Gandula (*Myoporum bontioides* A.)	*Phoma sp.*	Acetato de etilo del micelio	 Macrosporina	Difusión en agar-MIC	3.75 µM contra *Fusarium oxysporum*	Huang et al, 2017

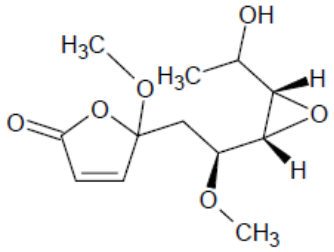
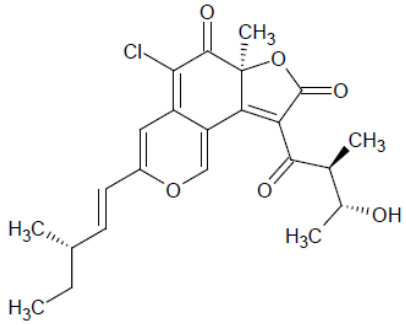
FUENTE VEGETAL	HONGO ENDÓFITO	EXTRACTO	COMP. AISLADO	ENSAYO BIOLÓGICO-VARIABLE MEDIDA	RESULTADO	REF
Árbol del curry (*Murraya Koenigii*)	*Curvularia* sp	Acetato de etilo del micelio	 Murranolida A	Difusión en agar- IC_{50}	100 µM contra *Phytophthora capsici*	Mondol et al, 2017
Trattinnickia rhoifolia	*Meyerozima* sp.	Acetato de etilo del micelio	 Chaetoviridina A	Difusión en agar-% inhibición de crecimiento a 40 µM	64% contra *Fusarium oxysporum*	Fierro-Cruz et al, 2017

TABLA 7. Acción antifúngica encontrada en compuestos aislados en hongos endófitos.

La información que se muestra en la tabla 7 nos permite afirmar que los hongos endófitos presentes en diversas especies botánicas son organismos capaces de controlar los efectos nocivos de fitopatógenos invasores, esto confirma la relación de competencia de estos microorganismos dentro de la planta como se había descrito anteriormente; la acción benéfica de los endófitos se comprueba gracias a los diversos métodos de estudio de determinación de actividad antifúngica realizados en su gran mayoría de manera *in vitro*, ya que se pueden controlar los parámetros de evaluación, obteniendo resultados eficaces y certeros como se puede apreciar.

Se evidencia que existen metabolitos secundarios producidos por los hongos endófitos los cuales presentan una acción antifúngica directa, estos serían los responsables de inhibir y controlar el crecimiento e infección de los patógenos presentes en la planta, como se puede ver en la tabla hay una gran diversidad estructural de compuestos incluyendo sustancias orgánicas volátiles responsables de esta acción.

La tabla nos muestra que los compuestos producidos por un solo hongo endófito, presentan acción antifúngica sobre varios fitopatógenos; para los patógenos de interés de la presente revisión se presentan 3 reportes de control para *Colletrotrichum gloeosporioides*, mientras que para *Phytophthora cinnamomi* no hay ningún estudio al respecto, sin embargo, para el género *Phytophthora* si, esto nos indica la necesidad de ampliar los estudios para *C. gloeosporioides* y empezar hacer los estudios al respecto para el control de *P. cinnamomi*.

No se han encontrado estudios en la especie *Persea americana* en las variedades colombianas frente a la identificación de los hongos endófitos, ni las acciones que estos puedan presentar, hasta el momento las investigaciones se han concentrado solo en la identificación de especies endófitas, la determinación de su posible patogenicidad y en probar su efecto antifúngico mediante confrontación directa; pero no se han determinado cuales son los compuestos responsables de las acciones observadas.

En un estudio realizado por Shetty y colaboradores, en variedades de aguacate de la Florida (USA), se determinó la presencia de 18 hongos endófitos en parte aérea de *Persea americana*, de los cuales se caracterizaron molecularmente 11 cepas que resultaron

inocuas para la especie hospedante en el test de patogenicidad. Las especies reportadas fueron: *Alternaria eichhorniae, Cladosporium tenuissimum, Corynespora cassiicola, Colletotrichum alatae, Diaporthe fraxiniangustifoliae, Lasiodiplodia gonubiensis, Neofusicoccum algeriense, Neofusicoccum andinum, Neopestalotiopsis foedans, Phyllosticta capitalensis y Strelitziana africana*. (Shetty et al, 2016).

El otro reporte existente muestra la actividad antifúngica del hongo endófito *Isaria fumosorosea* aislado de parte aérea de aguacate proveniente de plantaciones del sur de la Florida. La especie endófita presentó acción antagónica frente al hongo *Raffaelea lauricola*, responsable de la enfermedad “marchitez del laurel”, que provoca graves daños en el xilema del árbol de aguacate. (Ploetz et al, 2017)

Se ha demostrado que los hongos endófitos son agentes biocontroladores frente a los fitopatógenos invasores en diversas especies botánicas, los resultados que se muestran en el presente documento indican que los endófitos son capaces de controlar la acción del patógeno *Colletrotrichum gloeosporioides* y especies del género *Phytophthora*, y es por esto que los hongos presentes en las diversas variedades cultivadas en el territorio colombiano deben poseer esta acción antifúngica frente a los patógenos asociados al cultivo.

Teniendo en cuenta todo el panorama anterior, en el que se evidencia claramente por multiples estudios que los hongos endófitos producen compuestos que pueden llegar a generar acción antifúngica, A continuación, se describirán los mecanismos de acción que los endófitos utilizan en el control de los fitopatógenos.

2.2.1.2.4 Mecanismos de acción de hongos endófitos contra hongos fitopatógenos.

La protección que ofrecen los hongos endófitos frente a la presencia de microrganismos patógenos se da por medio de tres mecanismos:

- Directo: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios que tienen actividad anti- fúngica, y que son producidos directamente por los hongos endófitos.
- Indirectos: consiste en la inducción o incremento en la expresión o activación de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera

- Ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico. (Sanchez.et.al.,2013)

La interacción entre el hongo endófito y la planta se puede dar desde el mutualismo hasta la patogénesis, las relaciones mutualistas son las benéficas, ya que estos microorganismos absorben los nutrientes del suelo y protegen la planta, en compensación se estimula la proliferación y esto se traduce en crecimiento para la planta y se presenta el aumento en la producción de metabolitos secundarios ayudando así a la planta a la defensa de herbívoros y microorganismos patógenos. (Sanchez et.al.,2013). También se ha encontrado que estos microrganismos colaboran con otras condiciones dentro de las que cabe resaltar, mayor competitividad, mayor tolerancia a factores de estrés como la presencia de metales pesados, pH bajo, salinidad alta, e infecciones microbianas. (Zhang et, al.2006).

Todas las acciones protectoras se logran gracias a la detección celular que han desarrollado estos microorganismos, ya que se ha encontrado que tienen la capacidad de detectar la señalización y el estrés inducido que activa diversas moléculas a nivel celular en las plantas, existen dos hipótesis sobre la producción de los metabolitos secundarios al interior de una especie botánica, la primera se relaciona con el hecho de que los hongos endófitos imitan el perfil de la producción de los metabolitos secundarios, la segunda teoría plantea que algunos de los metabolitos producidos y encontrados en las diversas especies botánicas son un producto exclusivamente de sus respectivos endófitos. (Venugopalan et al, 2015)

Las acciones biológicas de los hongos endófitos son de gran importancia, no obstante, los resultados encontrados y reportados, no serían posibles sin un adecuado procedimiento de aislamiento, purificación de estos, a continuación se hará una descripción de estos procedimientos.

2.2.1.2.5. Métodos de aislamiento y purificación.

En diferentes apartes de este documento de ha demostrado la importancia del estudio de los hongos endófitos, por esto es necesario contar con un material vegetal el cual este en óptimas condiciones; esto indica que no presente ningún signo de enfermedad y/o

laceración, que no haya sido tratado con ningún tipo de fungicida o agro químico, ya que las presencias de estos pueden afectar el procedimiento del aislamiento (Liu et al, 2001).

El proceso general para llegar a la identificación de los hongos y los compuestos responsables de las diversas acciones biológicas incluyendo la acción antifúngica se evidencia en la **Figura 30.**

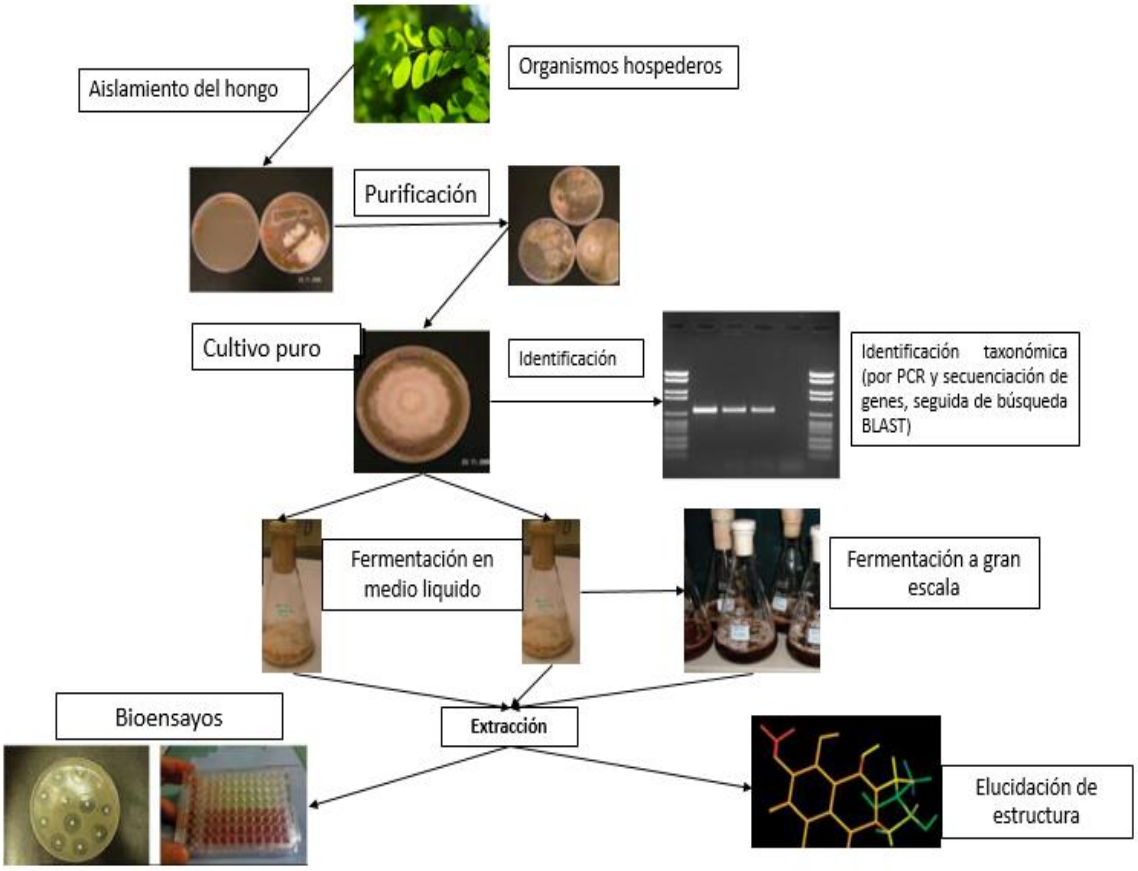


Figura 30. Proceso de aislamiento, purificación y fermentación de microorganismos endófitos. Tomado de Kjer et al, 2010

A continuación, se describirá detalladamente los pasos necesarios para el aislamiento, el aumento de la biomasa por fermentación, necesaria para los estudios químicos y los bioensayos de determinación de actividad.

➢ Proceso de esterilización

El tejido seleccionado debe ser sometido a un proceso de estilización este proceso consta de los siguientes reactivos:

- Agua (corriente).
- Etanol (C_2H_5OH) al 70- 75% por 1min
- Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% por 5 min.
- Agua estéril por tres veces.

Los pasos para realizar la esterilización son:

- ✓ Se cortan las muestras en pequeños segmentos de 1cm por 1cm.
- ✓ Se enjuaga con agua corriente por 2min.
- ✓ Se sumerge la muestra en etanol por 1min.
- ✓ Luego se pasa por hipoclorito de sodio por un tiempo de 5min Si el tratamiento es muy corto no quedara bien esterilizado, por el contrario, si es muy largo puede afectar los hongos en las partes internas del tejido.
- ✓ Finalmente se enjuaga con agua estéril por tres veces. (Prakash, 2015)

➢ Proceso de aislamiento

Después del proceso de esterilización pueden hacerse cortes transversales al tejido, el cual debe ser dividido en secciones pequeñas (3-5mm^2) aproximadamente, este corte también se debe realizar de manera aséptica (Salgado et al, 2005). Se pasa la pieza cuidadosamente sobre la superficie de una placa de Petri que contenga el medio de cultivo de aislamiento, se sella la caja y se coloca a 20- 25 C^0.

Existen dos procesos de aislamiento, el primero es el cual los tejidos de la planta ya esterilizados se colocan en medio agar- agua, luego del crecimiento de las hifas se colocan en medios de PDA (agar papa dextrosa) y se observa el crecimiento del micelio. En el segundo método el tejido estéril se tritura y se coloca en medio PDA, (Strobel et al, 1996), también se presentan modificaciones de este proceso por ejemplo el uso del agar de malta (Adebola et al, 2016) o el sustrato sólido de cebada (Kjer et al, 2010) para evitar la contaminación en el crecimiento se recomienda colocar en el medio tetraciclina, ampicilina, la temperatura de incubación se encuentra entre los 25 y 28 °C, el periodo de incubación

oscila entre 15 y 30 días, dejando las colonias expuestas a luz y a oscuridad. (Ramírez et al, 2006).

Luego del periodo de incubación se identifican las colonias que mostraron esporulación y crecimiento un ejemplo se ve en la **Figura 31**, las que no relevan este proceso se consideran micelios estériles, la identificación de la cepa o colonia se realiza mediante la amplificación de ADN, la amplificación se compara en diferentes bases de datos de nucleótidos, con el fin de identificar el género y la especie si es posible. (Chen et al, 2014)

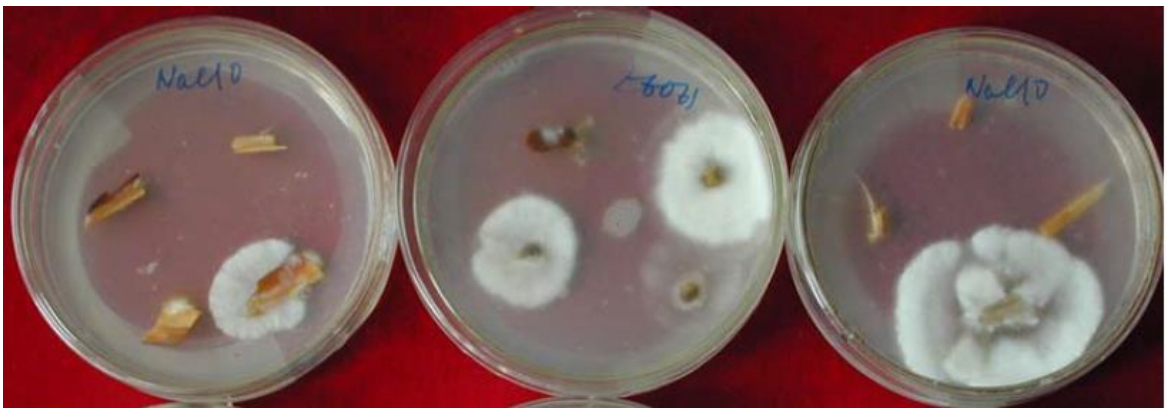


Figura 31. Aislamiento y crecimiento primario de colonias de hongos endófitos provenientes de diversos tejidos. Tomado de Zhou et al, 2010

La purificación de las cepas fúngicas, se produce a partir del crecimiento de las colonias, se transfieren las puntas de las hifas las cuales son cortadas con un asa estéril en una caja de Petri con medio de cultivo, las cepas puras crecen en un periodo de 1 a 2 semanas. (Zhou et al, 2010)

2.2.1.2.6. Métodos de fermentación.

La fermentación se realiza a partir del agar solido del aislamiento, este proceso se puede hacer en medio liquido o en medio sólido, las **Figuras 32** y **33** muestran el proceso de fermentación en medio líquido a pequeña y gran escala, el tiempo promedio el cual se puede demorar es de 3 a 6 semanas dependiendo del medio, el procedimiento de fermentación de manera general es el siguiente:

- ✓ Se corta la cepa en trozos pequeños de dimensiones 1,2 cm X 1,2 cm aproximadamente.

- ✓ Se coloca la cepa en el medio de cultivo liquido del cual se requiere 300ml; para medio solido se requiere 210gr.
- ✓ Se agregan 250 ml de acetato de etilo en el caso del medio de cultivo líquido, el acetato aumenta la humectabilidad de las esporas.
- ✓ Luego de un proceso de almacenamiento largo, las cepas se transfieren a tubos falcon de 10 ml con 5 ml del medio de cultivo líquido, este se deja por 3 días a temperatura ambiente para su crecimiento, luego se pasa a refrigeración a 4C^{o} por 2 horas, luego a – 20 C^{o} por dos horas y finalmente se deja a – 80 C^{o}.

El medio liquido puede contener glucosa 10g/L, peptona 2g/L, extracto de levadura 1g/l y sal marina 2g/L, extracto de malta 5g/L. La fermentación de estado sólido (FES) se caracteriza por un proceso en un soporte solido el cual tiene un bajo contenido de humedad, este puede darse bajo condiciones no asépticas y naturales, los sustratos usados para este tipo de fermentación son: arroz, maní, cascava, coco, harina, tusa de maíz, avena y soya, estos se pueden usar solos o en combinación (Robinson et al, 2001), un diagrama del protocolo general de fermentación y extracción del medio de cultivo solido se muestra en la **Figura 34.**

Cabe resaltar que los metabolitos secundarios son principalmente producidos en fermentación en estado líquido, ya que el proceso por este método es más simplificado, permite más control en factores como pH, calentamiento, condiciones nutricionales, sin embargo, en la FES permite una mayor circulación de oxigeno lo cual no es posible con el otro método. (Robinson et al, 2001)

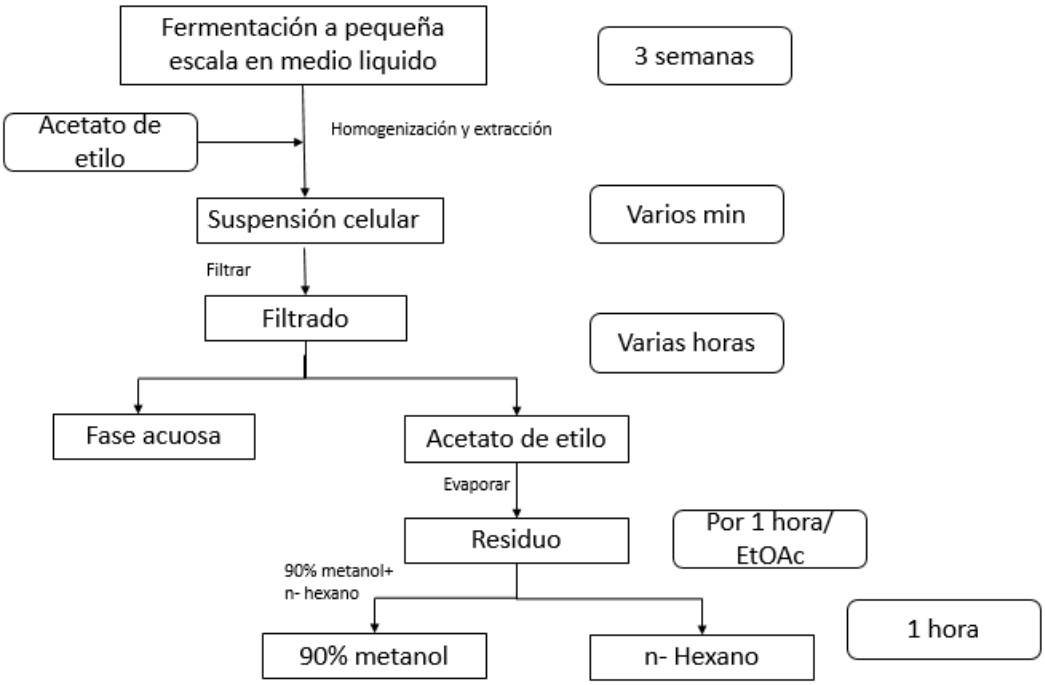


Figura 32. Estimación del tiempo requerido para la fermentación de hongos y el tratamiento de extractos de medio líquido a pequeña escala. Tomado de Kjer et al, 2010.

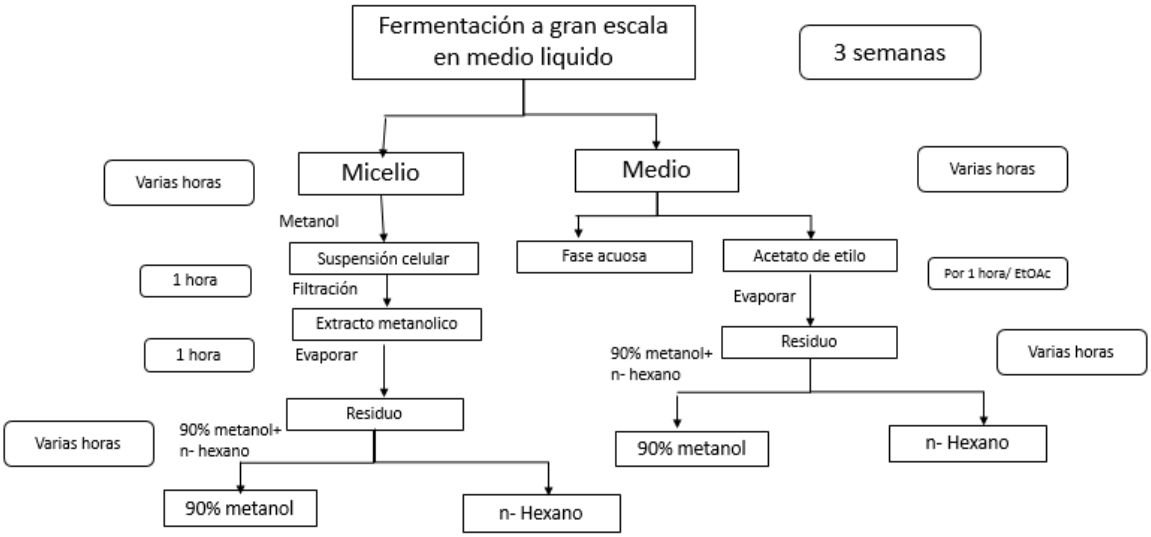


Figura 33. Estimación del tiempo requerido para la fermentación de hongos y el tratamiento de extractos de medio líquido a gran escala. Tomado de Kjer et al, 2010

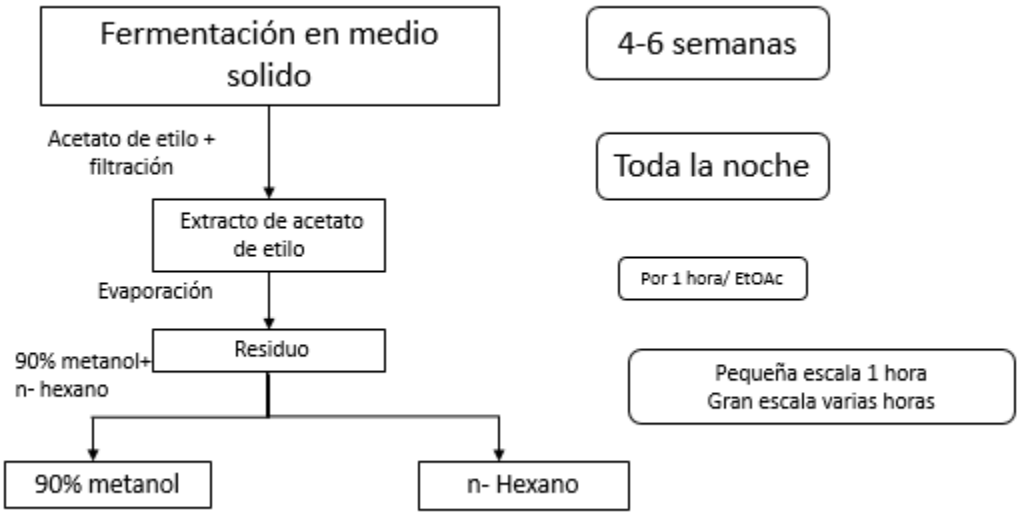


Figura 34. Estimación del tiempo requerido para la fermentación de hongos y el tratamiento de extractos de medio solido a pequeña escala. Tomado de Kjer et al, 2010.

2.2.1.2.7. Métodos de extracción

El proceso de extracción depende del procedimiento de fermentación si se realizó a pequeña escala en medio liquido los pasos a seguir son los siguientes:

- ✓ Se mezcla el contenido del matraz, la fermentación con los 250 ml de acetato de etilo, se llevan a centrifugación a 4000 rpm (revoluciones por minuto), por un espacio de 10 min.
- ✓ Se filtra la mezcla con el proceso de filtración al vacío, con la ayuda del embudo Büchner, desechado el residuo.
- ✓ El filtrado se debe trasferir a un embudo de decantación, para hacer la separación del acetato y del agua, la fase acuosa se extrae tres veces más con el acetato de etilo, de manera tal que entre filtración y filtración desaparezca la coloración.
- ✓ Para evitar contaminación con el medio ambiente se debe usar detergente antimicrobiano.
- ✓ El residuo del acetato se seca, usando rota-evaporación a 40C^{o}, dejando un sólido oleoso.
- ✓ Se mezcla el sólido con una combinación de metanol al 90% y n- Hexano en una proporción 1:1.
- ✓ Se separan las fracciones y se secan usando rota-evaporación a 40C^{o}, dejando un sólido oleoso.

Para la fermentación a gran escala en medio de cultivo liquido se debe considerar el siguiente procedimiento.

- ✓ Se separan los micelios del medio de cultivo y estos se depositan en metanol y se deja por una noche
- ✓ La mezcla se lleva a centrifugación a 4000 rpm (revoluciones por minuto), por un espacio de 10 min.
- ✓ Se filtra la mezcla con el proceso de filtración al vacío, con la ayuda del embudo Büchner, desechado el residuo.
- ✓ El filtrado se debe trasferir a un embudo de decantación, para hacer la separación del acetato y del agua, la fase acuosa se extrae tres veces más con el acetato de etilo, de manera tal que entre filtración y filtración desaparezca la coloración.
- ✓ Para evitar contaminación con el medio ambiente se debe usar detergente antimicrobiano.

Para el medio sólido, su extracción consta del siguiente procedimiento:

- ✓ Se corta el medio de cultivo que contiene el micelio, luego se introduce en acetato de etilo por 1 día.

- ✓ Se filtra la mezcla con el proceso de filtración al vacío, con la ayuda del embudo Büchner, desechado el residuo.
- ✓ La fase del acetato de etilo se debe mezclar con agua para la eliminación de los azucares.
- ✓ El filtrado se debe trasferir a un embudo de decantación, para hacer la separación del acetato y del agua, la fase acuosa se extrae tres veces más con el acetato de etilo, de manera tal que entre filtración y filtración desaparezca la coloración.
- ✓ El residuo del acetato se seca, usando rota-evaporación a 40C^{o}, dejando un sólido oleoso.
- ✓ Se mezcla el sólido con una combinación de metanol al 90% y n- Hexano en una proporción 1:1.
- ✓ Se separan las fracciones y se secan usando rota-evaporación a 40C^{o}, dejando un sólido oleoso.

Cabe resaltar que pueden presentarse variaciones entre los solventes usados en la extracción ya que pueden haber combinaciones como metanol (CH_3OH), cloroformo ($CHCl_3$) y acetato de etilo ($CH_3COOCH_2CH_3$) en proporciones de 1:1:1, se concentra a una temperatura por debajo de los 50°C, y el proceso de extracción se realiza 5 veces, el micelio se somete a una cromatografía en gel de sílice usando un gradiente de éter de petróleo a acetato de etilo y de acetato de etilo a metanol, luego los fragmentos que se obtengan se eluyen con diferentes concentraciones de éter de petróleo y acetato de etilo. (Guo et al, 2007).

Cuando en el proceso de fermentación liquida queda con sólidos en suspensión, se recurre a la técnica conocida como extracción en fase solida (EFS) la cual permite que la muestra quede sin partículas e impurezas. (Zaher et al, 2014)

- ➢ **Bioensayos**

Luego del proceso de fermentación y extracción se realizan los bioensayos que determinan la efectividad la acción antifúngica, dentro de los métodos de estudio de la sensibilidad antifúngica que se realizan de manera regular se encuentran: difusión en agar, bioautografía directa, microdilución y difusión de disco. A continuación, se describirán brevemente estos métodos.

- ✓ **Método de difusión en agar**

Se deposita el inoculo y se siembra sobre la superficie de agar selectivo dependiente del hongo a ensayar; el agar se ubica en una caja de Petri, seguido se hacen pozos sobre la superficie del agar con la ayuda de un sacabocado estéril. En cada uno de ellos se depositan 10 a 25 µL, de los extractos, fracciones, compuestos puros, y controles, a evaluar dispuestos en diferentes concentraciones. Finalmente se inoculan a 25-30 ºC por un periodo de 5 días, después del cual se mide el halo de inhibición. (Sánchez, 2016)

- ✓ **Método de difusión de disco**

Se realiza la inoculación y siembra sobre una superficie de agar selectivo dependiente del hongo a ensayar, en la cual se colocan discos de papel filtro estériles impregnados con 10 a 25 µL, de solución de los extractos, fracciones, compuestos puros, y controles, a ensayar, dispuestos en diferentes concentraciones. La caja con el agar se inocula a 25-30 ºC, por 5 días. Posteriormente se miden los halos de inhibición. (Sánchez, 2016)

- ✓ **Método de bioautografia directa**

El extracto crudo a evaluar se coloca sobre una placa de cromatografía en capa fina, luego es eluído con una mezcla con apropiada de solventes de dos polaridades diferentes, permitiendo la separación de los compuestos del extracto, La placa luego del proceso de elución, es asperjada con una suspensión de conidias del hongo de interés, el cual se encuentra en crecimiento activo y en un medio salino de cultivo adecuado. La placas se incuban en una cámara húmeda por 24 horas, después de este tiempo se asperjaron con una solución de cloruro de 2, 3,5-trifeniltetrazolio (TTC) de 10mg/ml, reactivo que es usado como el indicador de viabilidad celular. A las 72h se realizan lecturas de las zonas de inhibición sobre la placa Después del tiempo de incubación se pueden observar zonas donde no se presenta crecimiento, estas corresponderían a los compuestos anti fúngicos. (Albarracín, 2016)

- ✓ **Método de microdilución**

El ensayo de microdilución se realiza para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración inhibitoria 50 (CI50) de los compuestos aislados, las fracciones y los extractos. A partir de cada extracto se preparó una solución stock de 1000 ppm y por diluciones seriadas se obtuvieron 8 concentraciones entre 250 ppm y 1.95 ppm. Para las fracciones y compuestos puros se preparan soluciones stock de 500 ppm con un rango de

concentraciones entre 125 ppm y 0.98 ppm. Dependiendo del rango de concentración en el cual resultara la CMI, se realiza un segundo ensayo donde se prueba un rango de concentraciones más reducido para lograr un dato de CMI más preciso. Las soluciones stock se realizan en DMSO y con 10 µL de tween 80, si es necesario.

Se utilizan microplacas de 96 pozos donde se colocan 150 µL de una solución de esporas del hongo a evaluar de $1x10^6$ UFC/ml en medio de cultivo líquido, luego 150 µL de las soluciones seriadas de los extractos, fracciones y/o compuestos. Las microplacas se incuban por 24 horas a 26°C, luego de este tiempo se adiciona 20 µL del indicador de viabilidad celular TTC a una concentración de 20 mg/mL. Se toma la lectura de absorbancia a las 24 y 48 h una vez agregado el TTC. La CMI se define como la concentración más baja a la cual un agente anti fúngico inhibe el crecimiento del hongo ensayado después de ser incubado. Se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI50) por medio del software Statgraphics, haciendo uso del análisis probit. El ensayo se realizó por triplicado. (Albarracín, 2016)

- **Elucidación de estructuras**

  Con las muestras de interés aisladas y purificadas se pueden realizar los análisis para la identificación de compuestos, los métodos de análisis más usados son RMN y los diferentes tipos de estudios que se pueden realizar bajo esta técnica, como ^{1}H RMN, ^{13}C RMN, HSQC RMN, 2D RMN, RMN H, ^{1}H-COSY, RMN NOE. La espectrometría de masas es también muy usada, en la mayoría de los casos como técnica complementaria de la RMN. Las técnicas espectrometrícas, contemplan metodologías acopladas a cromatografía tanto en fase gaseosa como en fase líquida, las cuales se usan dependiendo de las características de la muestra analizada. (Jin et al, 2017)

3. CONCLUSIONES

La presente monografía sustenta que los trabajos experimentales que se desarrollen en la línea de bioprospeción de agentes fitosanitarios del grupo de investigación “Estudio Químico y de actividad biológica de Rutáceas y Myristicaceas Colombianas” de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá, son pertinentes, ya que se demuestra la presencia de hongos endófitos en diversas especies vegetales y la acción antifúngica que estos presentan, por consiguiente la búsqueda de los endófitos fungicos en las variedades de la especie *Persea americana* cultivadas en el territorio colombiano son relevantes puesto que no se presentan reportes hasta el momento respecto a los endófitos existentes en estas, y la acción antifúngica que pueden presentar frente a los patógenos que afectan el cultivo de manera significativa.

La presente revisión demuestra la acción antifúngica que poseen los hongos endófitos, frente a diversos fitopatógenos, de manera particular se muestra la acción de control frente a *Colletotrichum gloeosporioides* uno de los patógenos que afecta significativamente a la especie *Persea americana* en nuestro país lo que indica que los estudios que se realicen de los endófitos encontrados en la planta del aguacate, la acción antifúngica y los compuestos químicos responsables de esta acción serán un aporte significativo en la búsqueda de biocontroladores de fitopatógenos.

A pesar de que no se encuentran estudios de acciones antifúngicas por parte de hongos endófitos frente al oomicete *Phythopthora cinnamomi* otro patógeno que afecta el cultivo de aguacate en nuestro país, si se presentan estudios frente a especies del género *Phythopthora*, esto nos indica que las investigaciones encaminadas a la búsqueda de compuestos químicos provenientes de endófitos fúngicos provenientes de *P. americana* son bastante promisorias y de gran importancia.

4. RECOMENDACIONES

Ampliar los estudios de hongos endófitos y los compuestos producidos por estos, en otras especies botánicas de la familia Laureceae, enfocándose en la acción antifúngica que estos presenten, en pro de ampliar los aportes de biocontroladores de especies fúngicas que sean de interés particular para la línea de investigación bioprospección de agentes fitosanitarios.

Contemplar la revisión teórica de hongos endófitos presentes en otras familias botánicas ya conocidas o estudiadas en el grupo de investigación “Estudio Químico y de actividad biológica de Rutáceas y Myristicaceas Colombianas” de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá, las cuales contribuyan a la búsqueda biocontroadoles de origen natural frente a diversos fitopatógenos.

Ampliar el campo de estudio de los hongos endófitos y los compuestos producidos por estos que se presentan en diversas especies vegetales y que puedan contribuir a los estudios de las diversas acciones biológicas en asociación con otros grupos de investigación.

5.Bibliografía

Adebola, L.; Muid, S.; Mohamad, B. Identification of volatile secondary metabolites from an endophytic microfungus *Aspergillus nomius* KUB105*. Malaysian Journal of Analytical Sciences.***2016**, 20, 751-759.

Ajayi, O.; Awala, S.; Olalekan, O.; Alabi, O. Evaluation of Antimicrobial Potency and Phytochemical Screening of *Persea americana* Leaf Extracts against Selected Bacterial and Fungal Isolates of Clinical Importance. *Microbiology Research Journal International*. **2017**, 20, 1-11.

Albarracin, T. Estudio fitoquímico bioguiado de dos especies de *Endilcherias* colombianas en busca de agentes fitosanitarios para el control de *Colletrotichum Tamarilloi*. Tesis de Maestria. Universidad Nacional de Colombia. **2016**.

Albarracin, L.; Delgado, W.; Cuca, L.; Avila, M. Chemical constituents of the bark of *Endilcheria oreocola* (Laureceae) from Colombia. *Biochemical Systematics and Ecology*. **2017**, 74, 60-62

Albarracin, T.; Delgado, W.; Cuca, L.; Avila, M. New butyrolactone and other metabolites from the bark of *Endilcheria arenosa* aganistof the phytopathogen *Colletrotichum Tamarilloi. Natural Product Research.* **2017**, 14, 80-90.

Alurappa, R.; Bojegowda, M.; Kumar, V.; Mallesh, N.; Chowdappa, S. Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander L. Natural Product Research*.**2014**, 28, 2217–2220.

Amini, J., Farhang, V., Javadi, T. Nazemi, J. Antifungal Effect of Plant Esential Oils on Controlling *Phytophthora* Species. *Plant Pathology*. **2016**, 32, 16-24.

Arroyo, F., Moreno, J., Daza, P., Boianova, L., Romero, F. Antifungal Activity of Strawberry Fruit Volatile Compounds against *Colletotrichum acutatum. Journal of Agricultural and Food Chemestry.* **2007,** 55, 5701-5707.

Arukwe, U., Amadi, B.; Duru, M.; Agomuo, E.; Adindu, E.; Odika, P.; Lele, K.; Egejuru, L.; Anudike, J. Chemical Composition of *Persea americana* leaf, fruit and seed. *International Journal of Recent Research and Applied Studies.* **2012,** 11, 345-349.

Avalos Garcia, A.; Perez Urria, E. Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal*. **2009**, 2,119-145.

Avila, M., Patiño,O., Prieto, J., Delgado, W., Cuca, L. Flavonoides con actividad antifúngica aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). Revista Colombiana de Química**. 2011,** 40, 25-33.

Bae, H.; Roberts, D.; Lim, H.; Strem, M.; Park, S.; Ryu, C.; Melnick, R.; Bailey, B. Endophytic *Trichoderma* Isolates from Tropical Environments Delay Disease Onset and Induce Resistance Against *Phytophthora capsici*in Hot Pepper Using Multiple Mechanisms.*Molecular Plant-Microbe Interactions Journal.* **2011**, 24, 336–351.

Baraban, E.; Morin, J.; Phillips, G.; Phillips, A.; Strobel, S.; Handelsman, J. Xyolide, a bioactive nonenolide from an Amazonian endophytic fungus, *Xylaria feejeensis. Tetrahedron Letters.* **2013**, 54, 4058–4060.

Belline, M., Carabali, A., Kondo, T., Bacca, T. Biología del pasador del fruto del agua cate stenoma catenifer walsingham (*Lepidoptera: Elachistidae*) y búsqueda de sus posibles enemigos naturales. *Boletín científico. Centro de museos, Museo de Historia Natural*. **2014,** 18, 79-92.

Bernal Estrada, J., Díaz Diez, C., Osorio Toro, C., Tamayo Vélez, A., Osorio Vega, W., Córdoba Gaona, O., Tamayo Molano, J., Kondo Rodríguez, T., Londoño Zuluaga, M., Carabalí Muñoz, A., Varón Devia, E., Caicedo Vallejo, A., Sandoval Aldana, A., Forero Longas, F., García Lozano, J., Londoño Bonilla, M. "Actualización Tecnológica y Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) para el Cultivo de Aguacate. CORPOICA, **2014**, 285-312.

Biodiversity, Stress Tolerance, Host Protection and Antimicrobial Production. *Molecular Biotechnology International*. **2009,** cap 46.

Botanical- on line, Enero 2016, [Diciembre 2017]. Disponlble en:

Cao, L.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Yang, T.; Xhang, J.; Zhang, Z.; Shen, L.; Liu, J.; Ye, Y. Anti-phytopathogenic activity of sporothriolide, a metabolite from endophyte *Nodulisporium* sp. A21 in *Ginkgo biloba. Pesticide Biochemistry and Physiology.* **2016**, 129, 7-13.

Carabalí M., A.. Informe Técnico Final Proyecto "Generación de tecnología para el manejo sostenible de insectos perforadores de frutos de aguacate en Colombia". Corpoica. **2011**, 176.

Celis, J.; Mendoza, C.; Pachón, M,; Cardona, J.; Delgado, W.; Cuca, L. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía colombiana*.**2008**, 26, 97-106.

Chen, M.; Fu, Y.; Zhou, Q. Penifupyrone, a new cytotoxic funicone derivative from the endophytic fungus Penicillium sp. HSZ-43. *Natural Product Research.***2014**, 28, 1544-1548.

Coria, M. Ciclo de vida, fluctuacion poblacional y control del barrenador de la semilla del aguacate (*conotrachelus perseae barber, C. aguacatae B*.) (*Coleóptera: curculiónidae*) en Ziracuaretiro, Michoacan, Mexico. *Revista Chapingio Serie Horticultura.* **1999**, 5, 313-318

Coy, E., Cuca, L. Nuevo Alcaloide Oxoaporfínico y Otros Constituyentes Químicos Aislados de *Pleurothyrium cinereum* (*Lauraceae*). *Revista Colombiana de Química*. **2008**, 37, 127-134.

Dabas, D.; Shegog, R.; Ziegler, G.; Lambert, J. Avocado (*Persea americana*) seed as a source of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Desing*. **2013**, 19, 6133- 6140.

Dai, J.; Krohn, K.; Flörke, U.; Gehle, D.; Aust, H.; Draeger, S.; Schulz, B.; Rheinheimer, J. Novel Highly Substituted Biraryl Ethers, Phomosines D–G, Isolated from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus. European Journal of Organic Chemistry*. **2005**, 23- 5100-5105.

Dai, J.; Krohn, K.; Elsässer, B.; Flörke, U.; Draeger, S.; Schulz, B.; Pescitelli, G.; Salvadori, P.; Antus, S.; Kurtán, T. Metabolic Products of the Endophytic Fungus *Microsphaeropsis* sp. From *Larix decidua*. *European Journal of Organic Chemistry*. **2007**, 23- 4845–4854.

Davis, R.; Pierens, G. 1H and 13C NMR assignments for two new xanthones from the endophytic fungus *Xylaria* sp. FRR 5657. *Magnetic resonance in chemistry*. **2006**, 44, 966-968.

Deshmukh, S.; Verekar, S. Fungal endophytes: A potential source of antifungal compounds. *Frontiers in Bioscience*. **2012**, 2045-2070.

Ding, H., Won Chin, Y., Douglas Kinghorn, A., D'Ambrosio, M. Chemopreventive Characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*. **2007**, 17, 386–394.

Dinis, L., Peixoto, F., Zhang, C., Martins, L., Costa R., Gomez, J. Physiological and biochemical changes in resistant and sensitive chestnut (Castanea) plantlets after inoculation with *Phytophthora cinnamomi. Physiological and Molecular Plant Pathology.***2011,** 75, 146-156.

Domergue, F.; Helms, G.; Prusky, D.; Browse, J. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry*. **2000**, 54, 183-189.

Duarte, N., Schmidt, F., Teixeira, M., Figueira, G., Delarmelina., Aparecida, E., Sartoratto, A. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) sacc. in yellow passion fruit using C*ymbopogon citratus* essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology.* **2010,** 41, 66-73.
Ebel, J., Cosio, E. Elicitors of plant defense responses. International *Review of Cytology*. **1994,** 148,1-36.

El-Hawary, S.; Sayed, A.; Rateb, M.; Bakeer, W.; AbouZid, S.; Mohammed, R. Secondary metabolites from fungal endophytes of *Solanum nigrum*. *Natural Product Research*. **2017**, 31, 2568-2571.

Eyres, L.; Sherpa, N.; Hendricks, G. Avocado oil: a new edible oil from Australasia. *Journal of Lipid Technology*, **2001**, 10, 84–88.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentacion y la Agricultura). 2016. [5 febrero 2018]. Disponible en: http://faostat3.fao.org/faostatgateway/go/to/download/Q/QC/

Fierro-Cruz, J.; Jiménez, P.; Coy- Barrera, E. Fungal endophytes isolated from *Protiumheptaphyllum* and *Trattinnickia rhoifolia* asantagonists of *Fusarium oxysporum. Revista Argentina de Microbiologia.* **2017**, 49, 255-263.

Freeman, S., Prostasov, A., Sharon, M., Mohotti, K., Eliyahu, M., Okon-Levy, N., Maymon, M., Mendel, Z. Obligate feed requirement of *Fusarium sp*. nov., an avocado wilting agent, by the ambrosia beetle *Euwallacea aff. Fornicata*. *Symbiosis.***2013,** 4-7.

Galdames, R., Rojas, C. Hongos endófitos en gramíneas forrajeras y su asociación con la producción animal. *Praderas para Chile*. Ministerio de agricultura de Chile **1988,** Capitulo 15.

Gao, F.K., Dai, C., Liu, X.Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Microbiol. Resistens*. **2010**, 4, p1346-1351

Garcia, M.; Macias, N.; Lappe, P.; Hernandez, S.; Macias, M. Phytotoxic Potential of Secondary Metabolites and Semisynthetic Compounds from Endophytic Fungus Xylaria feejeensis Strain SM3e-1b Isolated from Sapium macrocarpum. *Journal of Agricultural and Food Chemestry.* **2016**, 64, 4255–4263.

Giffoni, J.; Salles, E.; Aguiar, R.; Nogueira, R.; Costa, J.; Medeiros, L.; Morais, S.; Gadelha, M. Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of Persea americana (avocado) seed extracts. *Revista da Socieda de Brasileira de Medicina Tropical.* **2009**, 42, 110-113.

González, A., Artrópodos asociados al cultivo de aguacate en Costa Rica. Actas V Congreso mundial del Aguacate, **2003,** 449-454.

Grisales, N., Rodríguez, P., Henao, J., Tamayo, P. Incidencia de *Colletotrichum* sp. en aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass) en Antioquia. *Agronomia Colombiana.* **2016,** 34, 918-921.

Guo, Z.; Shao, C.; She, Z.; Cai, X.; Liu, F.; Vrijimoed, P.; Lin, Y. 1H and 13C NMR assignments for two oxaphenalenones bacillosporin C and D from the mangrove endophytic fungus SBE-14. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **2007**, 439-441.

Han, M.; Liu, T.; Cai, X.; Chen, K.; Liu, C.; Brian, K.; Xue, Y.; Gu, Y. A new endophytic *Paraconiothyrium brasiliens* LT161 shows potential in producing antifungal metabolites against phytopathogens. *African Journal of Microbiology*. **2012**, 50, 7572- 7578.

Hardman, A. Pathogen profile *Phytophthora cinnamomi*. *Molecular Plant Pathology*. **2005**, 6, 589–604.

Herre, E., Mejia, L., Kyllo, D., Rojas, E., Maynard, Z., Butler, A*.,* Van Bael, S. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology*, **2007**, 88, 550-558.

Huang, S.; Xu, J.; Li, F.; Zhou, D.; Xu, L.; Li, C. identification and antifungal activity of metabolites from the mangrove fungus *Phoma* sp. L28. *Chemistry of Natural Compounds.* **2017**, 53, 237-240.

Hyde, K.; Cai, L.; McKenzie, E.; Yang, Y.; Zhang, J.; Prihastuti, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*. **2009**, 1-17. *Natural Product Research*, **2016**, 31, 861-869.

Jouda, J.; Demgne, J.; Mediesse, F.; Djama, C.; Golz, C.; Strohmann, C.; Kouam, S.; Wandji, J. Secondary metabolites from *Aspergillus japonicus* CAM231, an endophytic fungus associated with *Garcinia preussi. Natural Product Research.* **2017**, 8, 861-869

Jin, Z.; Gao, L.; Zhang, L.; Liu, T.; Yu, F.; Zhang, Z.; Guo, Q.; Wang, B. Antimicrobial activity of saponins produced by two novel endophytic fungi from *Panax notoginseng.Natural Product Research,* **2017**, 27, 1-5.

Johnny, L., Yusuf, U., Nulit, R. The effect of herbal plant extracts on the growth and sporulation of Colletotrichum gloeosporioides. *Journal of Applied Biosciences.* **2010,** 34, 2218-2224.

Kalvo, D. Busqueda de fuentes de control del hongo *Phytpthora cinnamomi* a partir de las hojas de la especie *Cinnamomun triplinerve* (Lauraceae. Tesis de pregrado. **2016**.

Kharwar, R.; Gond, S.; Kumar, A.; Mishra, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of Eucalyptus citriodora Hook., and their antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.**2010**, 11, 1941-1948.

Kim Ki, Y., Daoxin, L., Kolattukudy, P. Induction of Ca^{2+}-Calmodulin Signaling by Hard-Surface Contact Primes Colletotrichum gloeosporioides Conidia To Germinate and Form Appressoria. *Journal of Bacteriology*. **1998,** 19, 5144-5150.

Kim Ki, Y., Daoxin, L., Kolattukudy, P. Induction of Ca2+-Calmodulin Signaling by Hard-Surface Contact Primes Colletotrichum gloeosporioides Conidia To Germinate and Form Appressoria. *Journal of Bacteriology*. **1998,** 19, 5144-5150.

Kjer, J.; Debbab, A.; Aly, A.; Prosksh, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols*.**2010**, 5, 479-490.

Kongue, M.; Talontsi, M.; Rahim, H.; Tofazzal, M.; Oswald, R.; Laatsch, H. Banchromene and other secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium* sp. Obtained from *Piper guinensis* inhibit the motility of phytopathogenic *Plasmopara viticola* zoospores. *Tetrahedron Letters*. **2014**, 55, 4057-4061.

Kornsakulkarn, J.; Somyong, W.; Supothina, S.; Boonyuen, N.; Thongpanchang, C. Bioactive oxygen-bridged cyclooctadienes from endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC. 45011. *Tetrahedron.* **2015,** 71, 9112-9116.

Koul, M.; Meena, S.; Kumar, A.; Sharma, P.; Singamaneni, V.; Hassan, S.; Hamid, A.; Chaubey, A.; Prabhakar, A.; Gupta, P.; Singh, S. Secondary Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium pinophilum* Induce ROS-Mediated Apoptosis through Mitochondrial Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Planta Med.* **2016**, 82, 344-355.

Lemus, G., Ferreyra, R., Gil, P., Maldonado, P., Toledo, C., Barrera, C., Celedón, J. Boletín INIA 129: El Cultivo del Palto. Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias -INIA-. **2005**, 81.

León W. Anatomía Xilemática Caulinar de 14 Especies de la Familia *Lauraceae* . *Revista Forestación*. **2002,** 46, 15-25.

Li, E.; Jiang, L.; Guo, L.; Zhang, H.; Che, Y. Pestalachlorides A–C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta. Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, 16, 7894- 7899.

Li, X.; Zhang, Q.; Zhang, A.; Gao, J. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an Endophytic Fungus Associated with *Melia azedarach*, and Their Antifungal, Antifeedant,and Toxic Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.***2012**, 60, 3424-3431.

Li, W.; Yang, X., Yang, Y.; Duang, R.; Cheng, G.; Li, X.; Li, Q.; Qin, S.; Li, S.; Zhao, L.; Ding, Z. Anti-phytopathogen, multi-target acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities of metabolites from endophytic *Chaetomium globosum. Natural Product Research*. **2016**, 30, 2016-2019.

Liu, C.; Zou, W.; Lu, H.; Tan, R. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*.**2001**, 88, 277-288.

Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E., Taghavi, S., Mezgeay, M., Van der Lelie, D. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **2002**, 21, 583-606.

Lyle, S. *Fruit and Nuts*. Timber Press, Enero 2006 [Noviembre 2017], Disponible en: http://www.timberpress.com/books/fruit_nuts/lyle/0-88192-759-7

Ma, Y.; Zhang, H.; Zhao, J.; Li, X. Secondary anti-fungi metabolites from the endophytic fungus *Fusarium* sp. in *Eucommia ulmoides. Chemistry of Natural Compounds*.**2012**, 48, 170-171.

Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades del Aguacate. Gobernación del Tolima. **2010**. 4-15.

Manrique B., Carabalí, A., Kondo, D., Bacca, T. Biología del pasador del fruto del aguacate Stenoma catenifer Walsingham (Lepidoptera: Elachistidae) y búsqueda de sus posibles enemigos naturales. *Revista biológica y científica de historia natural*. **2014**,18, 79-92.

Meazza, G., Dayan, F., Wedge, D. Activity of Quinones on *Colletotrichum* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemestry.* **2003,** 51, 3824- 3828.

Mejia Velez, E. "AGUACATE *Persea Americana Mill".* Bayer. **2011**, 7-9

Mejia, L.; Rojas, E.; Maynard, Z.; Van Bael, S.; Arnold, E.; Hebbar, P.; Samuels, G.; Robbins, N.; Allen Herre, E. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control.* **2008**, 46, 4-14.

Meng, L., Ming-Li, X., Liu, Y.; Gui Wang, B. Polyoxygenated dihydropyrano[2,3-c]pyrrole-4,5-dione derivatives 4 from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231 and their antimicrobial activity. *Chinese Chemical Letters.* **2015,** 26, 610-612.

Meng, L.; Ming, X.; Liu, Y.; Wang, B. Polyoxygenated dihydropyrano[2,3-c]pyrrole-4,5-dione derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Penicillium brocae* MA-231 and their antimicrobial activity. *Chinese Chemical Letters*. **2015**, 26, 610-612.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015. [Enero de 2018]. Disponible en: https://www.minagricultura.gov.co/Paginas/default.aspx

Mondol, M.; Farthouse, J.; Islam, M.; Schüffler, A.; Laatsch, H.; Metabolites from the Endophytic Fungus *Curvularia* sp. M12 Act as Motility Inhibitors against *Phytophthora capsici* Zoospores. *Journal of Natural Products*. **2017**. 80, 347-355.

Mohammadi, A., Hashemi, M., Masoud Hosseini, S. Integration between chitosan and *Zataria multiflora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil for controlling *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of cucumber fruit rot. *Food Science and Technology.* **2016,** 65, 349-356.

Montes, R., Cruz, V., Martinez, G., Sandoval, G., Garcia, R., Zilch, S., Bravo, L.., Bermudez, K.., Florez, H. Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivo de Investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*. **2000**, 18, 125- 131.

Montilla, J., Londoño, M., Monsalve, D., Correa, G. Evaluación de Insecticidas para el Manejo de Monalonion velezangeli,Carvalho & Costa (*Hemiptera: Miridae*) en Aguacate. *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellin*.**2014**, 64, 141-7150.

Moreno, J. Actividad antifúngica de los extractos vegetales de *Piper eriopodum* y *Zanthoxylum monophyllum* y sus metabolitos secundarios sobre dos hongos fitopatogenos del clavel (*Dianthus caryophyllus*). Tesis de Maestria. Universidad Nacional de Colombia. **2011.**

Mukhopadhyay, N., Garrison, N., Hinton, D., Bacon,C, Khush, G., Peck, H., Datta, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathology* **1996**,134, 151–159.

Muñoz, D. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad fungicida e insecticida de la especie *Piper eriopodon* (Piperaceae). Tesis de Maestria. Universidad Nacional de Colombia. **2008**.

Nair, D., Padmavathy, S. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *The Scientific World.***2014**, 1-11.

Nelson, P. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. *Fungal wilt diseases of plants*. Bell and e.H. Beckman.**1981,** 51,80.

Nelson, S. Anthracnose of Avocado. *Plant Disease.* **2008,** 58, 1-6.

Nieto Solorzano, F. Manejo Fitosanitario del cultivo del aguacate Hass, medidas para la temporada invernal. ICA. 2012.

Oberlies, N.; Rogers, L.; Martin, J.; McLaughlin, J. Cytotoxic and Insecticidal Constituents of the Unripe Fruit of *Persea Americana. Journal Natural Products*. **1998**, 61, 781-785.

Okwu, D., Awurum, A., Okorononkwo, J. Phytochemical composition and *In vitro* auntifungal activity screeningof extracts from citrus plants aganist *Fusarium Oxysporum* of Okra Plant. *Pest tecnolhogy.* **2007**, 1, 145-148.

Owolabi, M.; Coker, A.; Jaja, S. Bioactivity of the phytoconstituents of the leaves of *Persea americana. Journal of Medicinal Plants Research*. **2010**, 4, 1130-1135.

Oliveira, C.; Silva, G.; Regasini, L.; Zanardi, L.; Evangelista, A.; Young, M.; Bolzani, V.; Bolzani, V.; Araujo, A. Bioactive Metabolites Produced by *Penicillium* sp.1 and sp.2, Two Endophytes Associated with *Alibertia macrophylla* (*Rubiaceae*).*Zeitschrift für Naturforschung C*. **2009**, 64, 824-830.

Pabón, L. Estudio químico del tallo y volátiles de hojas de Ocotea macrophylla (Lauraceae) y evaluación de actividad biológica. Tesis de Maestria. Universidad Nacional de Colombia. **2009.**

Pabón, L.; Cuca, L. Aporphine alkaloids from Ocotea macrophylla (Lauraceae). *Química Nova.* **2010**, 33, 875-879.

Pan, F.; Liu, Z.; Chen, Q.; Xu, Y.; Hou, K.; Wu,W. Endophytic fungus strain 28 isolated from *Houttuynia cordata* possesses wide-spectrum antifungal activity. *Brazilian Journal of Microbiology.***2016**, 47, 480-488.

Parra, J. Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de *Piper* cf. *Cumanense* Kunth (Piperaceae) Tesis de Maestria. Universidad Nacional de Colombia. **2011**.

Parra, J.; Delgado, W.; Cuca, L. Cumanensic aci, a new chromene isolated from *Piper* cf. *Cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry letters.* **2011**, 4, 280-282.

Parra, J.; Patiño, O.; Prieto, J.; Delgado, W.; Cuca, L. Anew benzoic aicd derivate isolated from *Piper* cf. *Cumanense* Kunth (Piperaceae). *Phytochemistry letters.* **2013**, 6, 590-592.

Patiño, W. Evaluación de la actividad antifúngica, insecticida y de inhibición enzimática de los extractos y aceites esenciales obtenidos de las especies *Piper* cf. *Asperiusculumvar*. *Glabricaule* y *Piper pertomentellum*. Tesis de Pregrado. Universidad Nacional de Colombia. **2015**.

Patiño, O.; Cuca, L. Chemical constitutens of the Wood of *Zanthixylum quinduense* Tul (Ruteceae). *Química Nova*.**2010**, 10, 1019-1021.

Pérez, A., Hernández, G., Fuentes, C. Uso de bacterias endófitas como control biológico sobre *phytophthora cinnamomi rands* causante de la pudrición radicular del aguacate (*Persea americana* Mill.). *Revista Colombiana de ciencia animal*. **2014**, 6, 213-222.

Periódico Contexto ganadero "Ica busca controlar pudrición radicular del aguacate en el caribe. Contexto Ganadero", enero 2014. [Noviembre 2016] Disponible en:http://contextoganadero.com/agricultura/ica-busca-controlar-pudricion-radicular-del-contr-en-el-caribe

Periódico el mundo "Colombia quiere abarcar el mercado de aguacate". Junio de 2014 [15 de noviembre de 2016] Disponible en: http://www.elmundo.com/portal/noticias/economia/colombia_quiere_abarcar_el_mercado_del_aguacate.php#.WB910SRgzIV.

Phoulivong, S., Cai, L., Cheng, H., McKenzie, E., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., Hyde, K. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity.* **2010,** 44, 33-43.

Prakash V. Endophytic fungi as resource of bioactive compounds. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*.**2015**, 1, 887-898.

Pietro, A., Madrid, M., Caracuel, Z., Delgado, J., Roncero, I. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus, *Molecular plant pathology.***2003,** 4, 315-325.

Prieto, J.; Pabón, L., Patiño, O.; Delgado, W.; Cuca, L. Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de las hojas de dos especies colombianas del genero *Ocotea. Revista Colombiana de Química.* **2010**, 39, 109-209.

Prieto, J.; Patiño, O.; Delgado, W.; Moreno, J.; Cuca, L. Chemical composition, insecticide and antifungicla activities of the esencial oils of fruits of three *Zantoxylum* species from Colombia. *Chliean Journal of Agricultural Research*.**2011**, 71, 72-82.

Prieto, J.; Patiño, O.; Pabón, L.; Plazas, E.; Guzman, J.; Avila, M.; Delgado, W.; Cuca, L. Natural products from plants as potential source agents for controlling *Fusarium*. In Fungicides- Showcase of integrated plant disease mnagament from around the world. In tech. **2013**. 233-278.

Pino Pérez, O., Jorge Lazo, F. Ensayo de artemia: útil herramienta de trabajo paraecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Protección Vegetal.* **2010***,* 22, 34-43.

Ploetz, R.; Hughes, M.; Kendra, P.; Fraedich, S.; Carrillo, D.; Stenliski, L.; Huler, J.; Mayfield, A.; Dreaden, T.; Crane, J.; Evans, E.; Schaffer, B.; Rollins, J. Recovery Plan for Laurel Wilt of Avocado, caused by *Raffaelea lauricola. National Plant Disease Recovery System.***2017.** 18, 51-77.

Prado, S.; Li, Y.; Nay, B. Studies in Natural Products Chemistry. Cap 8. Diversity and Ecological Significance of Fungal Endophyte Natural Products. **2012**, 250-252.

Qadri, M.; Johri, S., Shah, B.; Khajuria, A.; Sidiq, T.; Lattoo, S.; Abdin, M.; Riyaz-Ul-Hassan, S. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus*. **2013**, 2, 1-14.

Qadri, M.; Deshidi, R.; Shah, B.; Bindu, K.; Vishwakarma, R.; Riyaz-Ul-Hassan, S. An endophyte of Picrorhiza kurroa Royle ex. Benth, producing menthol, phenylethyl alcohol and 3-hydroxypropionic acid, and other volatile organic compounds. *World Jorurnal of Microbiology and Biotechnology*.**2015**, 31, 1647- 1654.

Ramirez, L.; Marin, D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*.**2009**, 42, 263-

Ramírez, G.; Morales, J.Primer informe de Cylindrocarpon destructans (Zinss) Scholten afectando plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill) en Colombia. *Protección vegetal.* **2013,** 28, 27-35.

Ranade, S.; Thiagarajan, P. A Review on Persea Americana Mill. (Avocado) - Its Fruit and Oil. *Pharm Tech.***2015**, 8, 72-77.

Robayo, A., Delgado, W., Cuca, L. El aguacate *Persea americana* Mill *(Lauraceae)* Origen, propiedades y estado actual en Colombia. *Química e industria.***2016,** 23, 21-29.

Rodríguez, D., Trejo, F., Rodríguez, R., Díaz, M., Sáenz, A., Hernández, F., Villareal, J., Peña, F. Antifungal activity in vitro of Rhus muelleri against Fusariumoxysporum f. sp. Lycopersici. *Industrial Crops and Products*. **2015,** 75,150–158.

Rodriguez, E., Cardenas, E., Hernandez, J., Gutierrez, A., Mayek, N. Análisis de la infección de *colletotrichum gloeosporioides* (penz.) penz. & sacc. de frutos aguacateros. *Revista Brasileira de fruticultura.* **2013**, 35, 898-905.

Rodríguez, R., White, J., Arnold, A.E.; Redman, R. Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. *New. Phytol*. **2009,** 182, 314-330.

Rodrigues de Carvalho, C.; Almeida, M.; Cantrell, C.; C.; Wedge, D.; Alves, T.; Leomar, C.; Sanzio, R.; Sales, P.; Murta, S.; Romanha, A.; Rosa, C.; Rosa, L. Biological activities of ophiobolin K and 6-epi-ophiobolin K produced by the endophytic fungus *Aspergillus calidoustus*. *Natural Product Research*. **2015**, 30, 478-481.

Romero-Correa, M., Villa-Gomez, R., Castro-Mercado, E., García-Pineda,E. The avocado defense compound phenol-2, 4-bis (1, 1-dimethylethyl) is induced by arachidonic acid and acts via the inhibition of hydrogen peroxide production by pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **2014**, 87, 32-41.

Rosado, C., Molinero, L., Rodríguez, R., Besallote, M. Antifungal activity of asparagus extracts against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. *Scientia Horticulturae.* **2014**, 171, 51–57.

Salgado, C.; Capero, M. Aislamiento de hongos endófitos en rosa (Rosa hybrida) en Bogotá, Colombia. *Revista Iberoamericana de micología*.**2005**, 99-101.

Sanchez, R., Sanchez, B., Sandoval, Y., Ulloa, A., Armendariz, B., Garcia, M., Macias, M. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolites secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. **2013,** 16, 132-146.

Sanchez, E.; Castillo, S.; Garcia, P. “Investigación en plantas de importancia medica”. Universidad Autonoma de Nuevo León, 2016, 81-83.

Sánchez, B.; Sánchez, R.; Duarte, G.; Lappe, P.; Rubalcava, M. Antifungal, anti-oomycete and phytotoxic effects of volatile organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto.Journal of Applied Microbiology*.**2016**, 120, 1313- 1325.

Sepulveda, G. Porta, H., Rocha, M. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Patologia.* **2003**, 21, 355-363

Schaffer, B.; Wolstenholme, N.; Whiley, A. “The Avocado”. **2013,** 24.25.

Schulz, B.; Rommert, A.; Dammann, U.; Aust, HJ.; Strack, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycolical Reseach*. **1999**, 103, 1275–1283.

Shao, C.; She, Z.; Guo, Z.; Peng, H.; Cai, X.; Zhou, S.; Gu, Y.; Lin, Y. 1H and 13C NMR assignments for two anthraquinones and two xanthones from the mangrove fungus (ZSUH-36). *Magnetic Resonance in Chemistry.* **2007,** 45, 434- 338.

Shao, C.; Wang, C.; Li, C.; She, Z.; Gu, Y.; Lin, Y. Microsphaeropsisin A, a new sesquiterpenoid isolated from the mangrove endophytic fungus (No. DZ39*). Natural Product Research.* **2009**, 23, 1579–1583.

Shentu, X.; Zhan, X.; Ma, Z.; Yu, X.; Zhang, C. Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic. *Brazilian Journal of Microbiology.***2014**, 45, 248- 254.

Shetty, K.; Rivadeneira, D.; Jayachandran, K.; Walker, D. Isolation and molecular characterization of the fungal endophytic microbiome from conventionally and organically grown avocado trees in South Florida. **2016**, 15, 987-989.

Silva- Hughes, A.; Wedge, D.; Cantrell, C.; Carvalho, C.; Pan, Z.; Moraes, R.; Madoxx,V.; Rosa, L.; Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associatedwith the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) fromthe United States. *Microbiological Research*. **2015**, 175, 67-77.

Singh, M.; Kumar, A.; Singh, R.; Pandey, K. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *Biotech*. **2017**, 7, 315-329.

Smith, C. Archeological evidence for selection in avocado. *Economic Botany.* **1966**, 20,169-175.

Soltani, J.; Mahdieh, S.; Moghaddam, H. Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Mediterranean Cypress *Cupressus sempervirens. Current Microbiology***. 2014**, 70, 580-586.

Song, J.; Pongnak, W.; Soytong, K. Antifungal Activity of Endophytic Fungi from Palm Trees Against Coffee Anthracnose Caused by *Colletotrichum Coffeanum. International Journal of Agricultural Technology*.**2016**,12, 623-635.

Strobel, G.; Yang, X.; Sears, J.; Robert, K.; Sidhu, R.; Hess, W. Taxol from Pestalotiopsis microspora, an endophytic fungus of *Taxuus wallachiana*. *Microbiology.***1996,** 142, 435-440.

Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products.* **2003**, 67, 257-268.

Sturz, A.The role of endophytic bacteria during seed piece decay and tomato tuberization. Plant Soil. **1995,** 175, 257–263.

Tabeshpour, J.; Marjan, Hosseinzadeh, H. Effects of Avocado (Persea americana) on Metabolic Syndrome: A Comprehensive Systematic Review. *Phytotherapy Research*. **2017**, 31, 819-837.

Tamayo Molano, P. Enfermedades del aguacate. *Politécnica*. **2007**, 1, 51-70.

Tapia, C., Amaro, J. Género *Fusarium. Revista chilena Infectol.***2006,** 31, 85-86.

Tata, A.; Perez, C.; Campos, M.; Bayfield, M.; Eberlin, M.; Ifa, D. Imprint Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging for Monitoring Secondary Metabolites Production during Antagonistic Interaction of Fungi. *Analitycal Chemestry*. **2015**, 87, 12298-12305.

Taxateca Tomado de http://www.taxateca.com. [15 de abril de 2017].

The plant list www.theplantlist.org/Lauraceae [15 de abril de 2017].

Tofiño, A., Cabal, D., Gil, L., Análisis de componentes del sistema productivo de aguacate, con incidencia probable de *Phytophthora* en Cesar, Colombia. *Avances en investigación agropecuaria.* **2012,** 16, 63-90.

Ulloa, A.; Medina, Y.; Sanchez, R.; Lappe, P.; Roque, G.; Duarte, G.; Herrera, T.; Macias,L. Phytotoxic and antimicrobial activity of volatile and semi-volatile organic compounds from the endophyte *Hypoxylon anthochroum* strain Blaci isolated from *Bursera lancifolia (Burseraceae). Journal of Applied Microbiology*. **2016**, 121, 380-400

Vega Yabrudy, J*.* "El aguacate en Colombia: Estudio de caso de los Montes de María, en el Caribe colombiano*".* Banco de la República. 2012, 40-167.

Wanga, B.; Zhanga, Z.; Guob, L.; Liu, L. New Cytotoxic Meroterpenoids from the Plant Endophytic Fungus *Pestalotiopsis fici*. *Helvetica China Acta.* **2016**, 99, 151–156.
Whiley, A. W., Schafer, B., Wolstenholme, B. N. The Avocado Botany, production and uses. *CABI Publishing*. **2002**, 25, 416.

Wang, F.; Jiao, R.; Cheng, A.; Tan, S.; Song, Y. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in Quercus variabilis and brefeldin A obtained from Cladosporium sp. World J *Microbiol Biotechnol*. **2007**, 23, 79– 83.

Wang, X.; Radwang, M.; Taráwneh, A.; Gao, J.; Wedge, D.; Rosa, L.; Cutler, H.; Cutler, S. Antifungal Activity against Plant Pathogens of Metabolites from the Endophytic Fungus *Cladosporium cladosporioides. Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2013**, 61, 4551-4555.

Wilson, D. Endophyte- the evolution of a term, and clasification of its use and definition. Oikos. **1995,** 73,274-276.

Xiao, J.; Zhang, Q.; Gao, Y.; Tang, J.; Zhang, A.; Gao, J. Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifungal, Antibacterial, Antioxidant, and Cytotoxic Activities. *Journal Agricutural and Food Chemistry*. **2014**, 62, 3584−3590.

Xiao, J.; Zhang, Q.; Gao, Y.; Shi, X.; Gao, J. Antifungal and antibacterial metabolites from an endophytic *Aspergillus* sp. associated with *Melia azedarach. Natural Product Research.***2014**, 28, 1388-1392.

Yang, R., Fan X., Cai X., Hu F. The inhibitory mechanisms by mixtures of two endophytic bacterial strains isolated from Ginkgo biloba against pepper phytophthora blight. *Biological Control*. **2015**, 85, 59–67.

Yong, Y.; Hai, Z.; Yong, S.; Liu, J.; Tan, R. Structural Revision of Aspernigrin A, Reisolated from Cladosporium herbarum IFB-E002. *Journal Natural products.* **2005**, 65, 1106-1108.

You, F.; Han, T.; Wu, J.; Huang, B.; Qin, L. Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology*.**2009**, 37, 162-165.

Yu, S.; Ding, G.; Liu, J.; Wang, J.; Fang, L. Secondary metabolites from the endophytic fungi Penicillium polonicum and Aspergillus fumigatus. *Journal of Asian Natural Products Research*. **2013**, 15, 446-452.

Varughese, T.; Rios, N.; Higginbotham, S.; Arnold, E.; Coley, P.; Kursar, T.; Gerwik, W.; Cubilla, L. Antifungal depsidone metabolites from *Cordyceps dipterigena*, an endophytic fungus antagonistic to the phytopathogen *Gibberella fujikuroi. Tetrahedron Letters*. **2012**, 53, 1624- 1626.

Venugopalan, A.; Srivastava, S. Endophytes as in vitro production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. **2015**, 33, 873- 887.

Vinale, F.; Nicolletti, R.; Lacatena, F.; Marra, R.; Sacco, A.; Lombardi, N.; d'Errico, G.; Digilio, M.; Lorito, M.; Woo, S. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus. Natural Product Research*. **2017**, 31, 1778- 1785.

Zaher, A.; Makboul, M.; Moharram, A., Calderon, A. LC–MS metabolitefingerprintingand MtSK-based screeningofan endophyte Bartalinia pondoensis Marinc of Citrus aurantum L. *Journal of Chromatography*.**2014**, 970, 18-23.

Zambrano, O. Consideraciones sobre el cultivo del aguacate (persea americana mill.). Origen del aguacate cultivado. Sinopsis taxonomica del genero Persea. *Revista de la Facultad de Agronomía Universidad del Zulia*. **1986,** 1, 1-7.

Zentmeyer, G. Origin and distribution of four species of *phytophthora. Transactions of the British Mycological Society*. **1988**, 91, 367-378.

Zhang, H.W., Song, Y.C., Tan, R.X. Biology and chemistry of endophytes*. Natural Product Reports*. **2006**, 23,753–771.

Zhang, G.; Zhang, Y.; Qin, J.; Qu, X.; Liu, J.; Li, X.; Pan, H. Antifungal Metabolites Produced by *Chaetomium globosum* No.04, an Endophytic Fungus Isolated from *Ginkgo biloba. Indian Journal of Microbiology.* **2013**, 53, 175-180.

Zheng, C.; Xu, L.; Li, Y.; Han.T.; Zhang, Q.; Ming, Q.; Rahman, K.; Qin, L. Cytotoxic metabolites from the cultures of endophytic fungi from *Panax ginseng. Applied Microbiology and Biotechonology*. **2013**, 97, 7617- 7625.

Zhou, X.; Zhu, H.; Liu, L.; Lin, J.; Tang, K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Microbiology Biotechnology.***2010**, 86, 1707-1717.g