



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

Facultad de Ciencias de la vida

Ingeniería en Biotecnología

**Caracterización preliminar de metabolitos secundarios de
Nigrospora sphaerica para el control de la moniliasis en
Theobroma cacao en Ecuador**

Stalin Bermúdez Puga

25 de marzo de 2021, ciudad de Tena, Napo, Ecuador.

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 25 de marzo de 2021

Yo, Stalin Armando Bermúdez Puga con documento de identidad N° 1207234665, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título “Caracterización preliminar de metabolitos secundarios de *Nigrospora sphaerica* para el control de la moniliasis en *Theobroma cacao* en Ecuador” son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:

Stalin Armando Bermúdez Puga

1207234665

ii

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Caracterización preliminar de metabolitos secundarios de *Nigrospora sphaerica* para el control de la moniliasis en *Theobroma cacao* en Ecuador”, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Stalin Armando Bermúdez Puga, bajo nuestra dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 25 de marzo de 2021

Firma:


Firmado electrónicamente por:
**PABLO ANDRES
CISNEROS PEREZ**

Pablo Andrés Cisneros Pérez

C.I: 1003237177

Firma:


Firmado electrónicamente por:
**LEOPOLDO ANTONIO
NARANJO BRICENO**

Leopoldo Antonio Naranjo Briceño

C.I. 1758579294

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) por permitirme realizar parte del trabajo de titulación en sus instalaciones

Al Ingeniero Jimmy Pico de la Estación Experimental Central de la Amazonía del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por proveerme cepas de *M. roreri*.

A Amazon Fungal-Station: R&D platform, biodiscovery and prototyping por permitirme realizar los últimos ensayos de mi Tesis sobre actividad biológica.

A mis tutores Dr. Pablo Cisneros y Dr. Leopoldo Naranjo por sus mentorías y dedicación en todo momento de mi carrera estudiantil

A los técnicos docentes de los laboratorios de Biología Molecular Docencia, Biología Molecular Investigación, Química y Productos Naturales de la Universidad Regional Amazónica Ikiam por su apoyo en la realización de mi tesis.

A Alex Sánchez por su valiosa ayuda en los últimos semestres de la carrera.

Al Ministerio de Ambiente y Agua del Ecuador por proveer los permisos de investigación por medio del Contrato Marco MAAE-DBI-CM-2021-0164.

Dedicatoria

A mis padres que mediante esfuerzo y dedicación se convirtieron en la base fundamental de haber alcanzado este sueño

A mis hermanos John y Sebastián que siempre estuvieron apoyándome en todo momento

A mis sobrinos Sophia, Barbara y John que han permitido ser mi fuente de inspiración

A Génesis Romero por haber sido una persona maravillosa en esta etapa universitaria

Índice general

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	iii
Agradecimientos	iv
Dedicatoria	v
Resumen.....	x
Abstract	xi
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1. ANTECEDENTES	1
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	15
1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	16
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	17
2.1. Cepas, crecimiento y mantenimiento	17
2.2. Ensayos de antagonismo de <i>N. sphaerica</i> HM-2 contra <i>M. royeri</i>	18
2.3. Crecimiento de biomasa de <i>N. sphaerica</i> HM-2 para la extracción de metabolitos secundarios	21
2.4. Extracción de metabolitos secundarios a partir de extractos crudos de <i>N. sphaerica</i> HM-2	22
2.5. Preparación de los extractos.....	22
2.6. Evaluación de los extractos obtenidos de <i>N. sphaerica</i> HM-2 contra <i>M. royeri</i>	23
2.7. Tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de <i>N. sphaerica</i> HM-2	24
2.8. Purificación de los extractos obtenidos de <i>N. sphaerica</i> HM-2	26
2.9. Cromatografía de capa fina	26
2.10. Caracterización de metabolitos secundarios de <i>N. sphaerica</i> HM-2 con propiedad antifúngica contra <i>M. royeri</i>	26
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	27

3.1. Ensayos de antagonismo	27
3.2. Tamizaje fitoquímico y análisis en cromatografía en capa fina	31
3.3. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos de <i>N. sphaerica</i> HM-2	34
3.4. Caracterización de metabolitos secundarios	36
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	40
4.1. Ensayos de antagonismo	40
4.2. Tamizaje fitoquímico y análisis en cromatografía en capa fina	42
4.3. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos de <i>N. sphaerica</i> HM-2	45
4.4. Análisis de metabolitos secundarios	46
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1. Conclusiones.....	48
5.2. Recomendaciones	49
REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antagónica de diferentes especies fúngicas frente a <i>M. roreri</i>	4
Tabla 2. Metabolitos secundarios aislados de <i>N. sphaerica</i> HM-2	6
Tabla 3. Composición de medio Czapek con arroz como fuente de carbono.....	21
Tabla 4. Codificación de los extractos evaluados.....	22
Tabla 5. Porcentajes de inhibición de <i>N. sphaerica</i> HM-2 contra cepas de <i>M. roreri</i>	30
Tabla 6. Cálculo del valor de factor de retención (Rf) en las placas con distintas fases móviles y reveladores.....	33
Tabla 7. Tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de <i>N. sphaerica</i> HM-2 a los 10, 20 y 30 días de haber sido incubado.	34
Tabla 8. Porcentajes de inhibición a las diferentes concentraciones de extracto.....	35
Tabla 9. Metabolitos aislados de <i>N. sphaerica</i> HM-2 en las particiones de hexano.	37
Tabla 10. Metabolitos aislados de <i>N. sphaerica</i> HM-2 en las particiones de Acetato de etilo	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de cacao a nivel mundial. Fuente de datos estadísticos: Baratau (2017).	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Frutos de cacao infectados por <i>M. royeri</i>	3
Figura 3. Placas madre en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) de a) <i>N. sphaerica</i> HM-2 y b) <i>M. royeri</i> Inia1	17
Figura 4. Esquema de cómo se realizó la siembra en los tratamientos.....	19
Figura 5. Resultados estadísticos de las pruebas de Levene, Shapiro-Wilks, Kruskal-Wallis y Bonferroni para el ensayo de antagonismo de <i>N. sphaerica</i> HM-2 contra trece cepas de <i>M. royeri</i> de distintas localidades de Ecuador.	28
Figura 6. Ensayo de antagonismo de <i>N. sphaerica</i> HM-2 contra diferentes cepas de <i>M. royeri</i>	30
Figura 7. Separación de compuestos por Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los extractos obtenidos de <i>N. sphaerica</i> HM-2 utilizando como solventes hexano (H) y acetato de etilo (A). Los extractos 10, 20 y 30 días sembrados en ese orden de izquierda a derecha en cada placa. Las placas fueron reveladas: a) Bajo luz UV de 254 nm; b) Bajo luz UV de 365 nm y c) Con sulfato cérico al 20%	32
Figura 8. Resultados estadísticos de las pruebas de Levene, Shapiro-Wilks y Kruskal-Wallis para la actividad antifúngica de los extractos crudos.....	36
Figura 9. Cromatograma del extracto 20 días particionado con hexano. Visualización de un cromatograma a partir de la inyección de un extracto obtenido en el LC-MS.....	37
Figura 10. Comparación de Rf en placas reveladas en UV de los extractos a) 20 días y b) obtenidos por Wu y colaboradores [30]	44
Figura 11. Estructuras de las moléculas antifúngicas reportadas por Wu y colaboradores: a) Nigrosporina A, b) Nigrosporina B y c) Nigrosporina C.	45
Figura 12. Estructuras de las moléculas antifúngicas encontradas de los extractos obtenidos.....	47

Resumen

El cacao es considerado un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial por el volumen de producción que se da cada año. Aun así, se registran variaciones en la producción por diferentes factores en donde la afectación por el hongo *Moniliophthora roreri* es el que más predomina, generando pérdidas económicas de hasta un 60% en la región Amazónica. Por esta razón, se deben buscar nuevas estrategias innovadoras para el control biológico de esta especie fitopatógena. Ensayos de antagonismo y caracterización de metabolitos secundarios antifúngicos en diferentes tiempos de incubación de *N. sphaerica* HM-2 fueron realizados. Los resultados preliminares mostraron que *N. sphaerica* HM-2 presenta un efecto antagónico mediado por antibiosis contra 10 cepas de *M. roreri* aisladas de toda la geografía del Ecuador. Además, se determinó que los extractos crudos obtenidos a los 20 días exhibieron una mayor inhibición en comparación a los 10 y 30 días, confirmando los resultados obtenidos por bioensayos de antagonismo. La alta actividad antifúngica de los extractos se atribuye a la presencia de las siguientes biomoléculas: ácido fitolacagénico, tilirósido, pogostona, filigenina y, de manera tentativa 4-preniloxiclavato, nigrosporamida A y 3-(3,4-dihidroxifenil-4,6,8trihidroxi)-1H-isocromeno. La capacidad antagonista y la identificación de compuestos con propiedades antifúngicas reportados previamente en la literatura científica, permiten establecer las bases para proponer a *N. sphaerica* HM-2 como potencial controlador biológico de *M. roreri* en el cultivo de cacao.

Palabras Claves: *N. sphaerica* HM-2, *M. roreri*, bioproductos, bioprospección, actividad antifúngica.

Abstract

Cocoa is considered a crop of great economic importance worldwide due to the volume of production that occurs each year. However, variations in production are registered due to different factors, where the affectation by the *Moniliophthora roreri* fungus is the most predominant, generating economic losses of up to 60% in the Amazon rainforest. For this reason, new innovative strategies should be sought as a biological control medium of this phytopathogenic species. Assays of antagonism and characterization of antifungal secondary metabolites at different incubation times of *N. sphaerica* HM-2 were performed. Preliminary results showed that *N. sphaerica* HM-2 has an antagonistic effect mediated by antibiosis against 11 strains of *M. roreri* isolated from Ecuador's entire geography. Besides, it was determined that the crude extracts obtained at 20 days exhibited greater inhibition compared to 10 and 30 days, confirming the results obtained by antagonism bioassays. The antifungal activity of the extracts is attributed to the presence of the following biomolecules: phytolaccagenic acid, tiliroside, pogostone, and phylligenin. Also, 4-prenyloxyclovatol, nigrosporamide A, and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,6,8-trihydroxy-1H-isochromen-1, were tentatively characterized. The high antagonistic capacity and the identification of compounds with antifungal properties previously reported in the scientific literature allow establishing the bases to propose *N. sphaerica* HM-2 as a potential biological control agent against *M. roreri* in cocoa cultivation.

Keywords: *N. sphaerica* HM-2, *M. roreri*, bioproducts, bioprospecting, antifungal activity.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. *Theobroma cacao* L.

1.1.1.1. Importancia económica del cacao

El cacao es considerado un cultivo de gran importancia económica por el volumen de producción que se da cada año a nivel mundial. En el 2013 se produjo un total de 4.3 millones de toneladas, lo que en ese momento representó ventas en 8400 millones de dólares americanos. En ese año, Ecuador aportó con 178 mil toneladas de cacao con un valor estimado de 433 millones de dólares [1]. Más recientemente, en el año 2018, Ecuador exportó 315.571 toneladas métricas de cacao, de los cuales, el 6.33% representó a productos semi-elaborados como licor, polvo, manteca, torta y nibs generando 47 millones de dólares de valor agregado para las comunidades indígenas y pequeños agricultores [2].

1.1.1.2. Factores asociados a la fluctuación en la producción de cacao

A lo largo del tiempo se han registrado fluctuaciones en la producción de cacao (figura 1). Los factores asociados a la variación en la producción de cacao incluyen: i) mal manejo de las plantaciones, ii) no renovación de las plantaciones (plantaciones envejecidas), iii) deterioro del suelo e iv) incidencias de plagas y enfermedades [3].



Figura 1. Producción de cacao a nivel mundial. Fuente de datos estadísticos: Baratau (2017).

Entre dichos factores, las enfermedades de origen microbiano son las que tienen un mayor impacto en el cacao, generando pérdidas económicas a nivel mundial hasta de un 30% en promedio [4] mientras que en la Amazonía ecuatoriana puede llegar hasta un 60% [5]. Las enfermedades que causan más perjuicio económico al agricultor cacaotero son moniliasis, escoba de bruja y mazorca negra [4,5]. La aparición de moniliasis y escoba de bruja datan de los años 1919 y 1922, respectivamente, las cuales arrasaron con la producción cacaotera en Ecuador en el año 1925, provocando, como consecuencia, un fuerte impacto socioeconómico y la conocida Revolución Juliana [6].

1.1.2. Moniliasis y estrategias para su control

1.1.2.1. Taxonomía del agente causal de la Moniliasis: *Moniliophthora roreri*

La moniliasis (figura 2) es una enfermedad infecciosa fúngica causada por *Moniliophthora roreri* [7], el cual está dentro de la familia Marasmiaceae [8]. Esta enfermedad fue reportada inicialmente en cultivos de cacao en Ecuador y Colombia. Sin embargo, en los últimos 15 años, *M. roreri* se ha diseminado hacia otros cultivos de cacao establecidos en otras regiones, tales como México en América Central, y es probable que en el futuro se

extienda a otras latitudes del planeta [9]. Hoy en día, los países latinoamericanos en los que se ven estas afectaciones son 11, incluido Ecuador [7].



Figura 2. Frutos de cacao infectados por *M. roseri*. Fuente: Fredy Amores

1.1.2.2. Estrategias de control para *M. roseri*

Las estrategias utilizadas para combatir esta enfermedad en el cacao se basan en el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIP), las cuales incluyen control cultural, control químico, control genético y control biológico [10–12]. El control cultural consiste en la rotación de cultivos, poda de mantenimiento, remoción de frutos infectados. En lo referente al control químico, se han utilizado sustancias protectoras para evitar la infección del fitopatógeno y fungicidas sistémicos [4] suplementados con sulfato de cobre para inhibir el crecimiento de *M. roseri* presente en los frutos del cacao [10]. Sin embargo, este segundo método ha sido muy poco efectivo [11] por la resistencia que pueden desarrollar los microorganismos a este tipo de compuestos [13]. Para el control genético, se han identificado y seleccionado materiales vegetales que ofrezcan resistencia ante esta enfermedad. A pesar de que las nuevas variedades de cacao (ICS1, ICS95, ICS39 y TSH565) reportan una mayor producción, éstas siguen presentando mediana o alta susceptibilidad a la moniliasis [4].

En cuanto al control biológico, este se caracteriza por el uso de microorganismos o sus compuestos enzimáticos o metabólicos para controlar a microorganismos fitopatógenos [14]. Se han utilizado algunas especies microbianas nativas de Colombia para el control de *M. roleri*, tales como *Clonostachys rosea*, *Clonostachys byssicola*, *Trichoderma* spp. y, *Bacillus brevis*, siendo, las dos últimas especies, las que muestran un mayor antagonismo contra *M. roleri* con inhibiciones in vitro de hasta un 90% [10].

Los mecanismos de acción por el cual ocurre el efecto antagónico entre microorganismos pueden ser por competencia de espacios y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis [15,16]. La competencia por espacios y nutrientes se caracteriza por el comportamiento disparejo de dos o más especies ante el espacio o nutrientes, en donde el requerimiento de estos factores por parte de uno de los microorganismos, reduce la cantidad disponible para el otro conllevando a una disminución en su población [17,18]. El micoparasitismo se basa en la introducción de las estructuras fúngicas del antagonista en las células del hongo hospedador (anastomosis) mediante la secreción de enzimas líticas [17]. La antibiosis se enfoca en compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana producidos por ciertos microorganismos con efectos inhibitorios hacia la germinación de esporas o crecimiento del micelio de otros microorganismos [19].

En la tabla 1, se muestran las especies de hongos biocontroladores más utilizados, así como sus mecanismos de acción para controlar a *M. roleri*. La reducción de las poblaciones de los agentes causales de enfermedades mediante control biológico sugiere que este debe ser complementario a otros mecanismos de control para disminuir el impacto de la enfermedad.

Tabla 1. Actividad antagónica de diferentes especies fúngicas frente a *M. roleri*

Hongo antagonista	Porcentaje de inhibición (%)	Mecanismo de acción	Referencias
<i>Paecilomyces</i> sp.*	80.72	Micoparasitismo	[20]
<i>Clonostachys</i> sp.*	13	Antibiosis	[13]

<i>Trichoderma</i> sp.**	21	Antibiosis	[13]
<i>Trichoderma reesei</i> *	93.5	Micoparasitismo	[21]
<i>Trichoderma ghanense</i> *	93.53	Micoparasitismo	[21]
<i>Trichoderma spirale</i> *	87.50; 96.4	Micoparasitismo	[21,22]
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> *	43	Antibiosis	[23]
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> *	63	Antibiosis	[23]
<i>Xylaria</i> sp.*	18	Antibiosis	[23]
<i>Xylaria feejeensis</i> *	8	Antibiosis	[23]
<i>Pestalotiopsis microspora</i> *	18	Antibiosis	[23]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> *	8	Antibiosis	[23]
<i>Trichoderma viridescens</i> *	86	Micoparasitismo	[24]
<i>Trichoderma virens</i> *	100	Micoparasitismo	[22]
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> *	100	Micoparasitismo	[22]
<i>Trichoderma harzianum</i> *	100	Micoparasitismo	[22]
<i>Trichoderma brevicompactum</i> *	94	Micoparasitismo	[22]
<i>Trichoderma koningiopsis</i> *	54	Micoparasitismo	[22]
<i>Trichoderma asperellum</i> *	55.5	Antibiosis	[22]
<i>Trichoderma koningiopsis</i> *	52.8	Antibiosis	[22]
<i>Trichoderma pleuroticola</i> *	46	Antibiosis	[22]
<i>Trichoderma harizianum</i> *	41.2	Antibiosis	[22]
<i>Trichoderma virens</i> *	37.9	Antibiosis	[22]
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> *	38.7	Antibiosis	[22]
<i>Trichoderma brevicompactum</i> *	31.7	Antibiosis	[22]

* Análisis in vitro

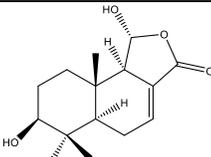
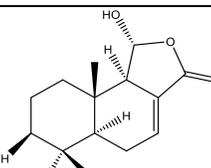
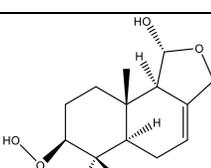
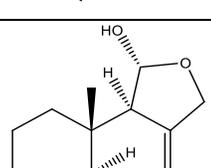
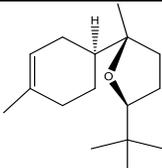
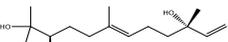
** Análisis en campo

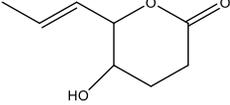
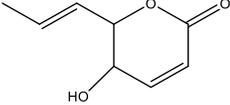
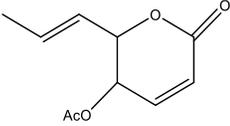
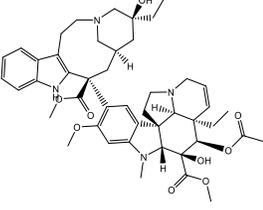
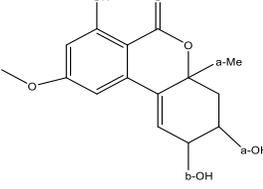
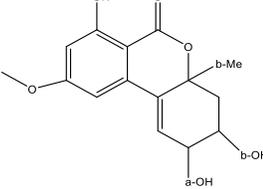
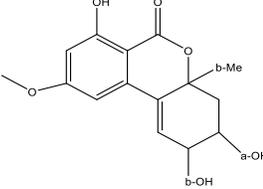
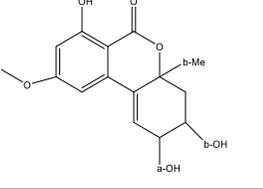
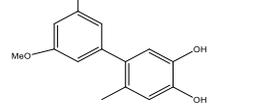
1.1.3. *Nigrospora sphaerica* y su potencial biotecnológico

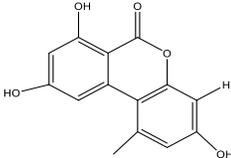
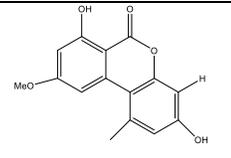
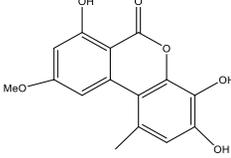
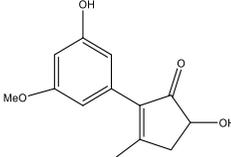
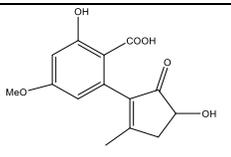
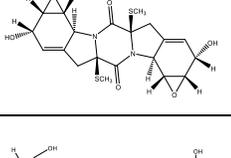
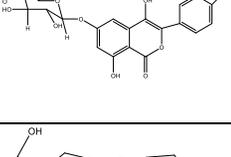
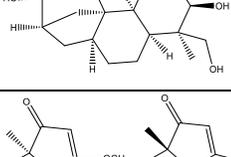
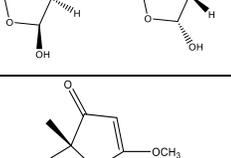
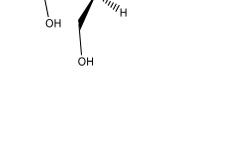
Nigrospora sphaerica es un hongo Ascomiceto que tiene una distribución cosmopolita y puede ser endófito o saprófito. Esta especie pertenece al género *Nigrospora*, el cual está dentro de la familia Apiosporaceae [25].

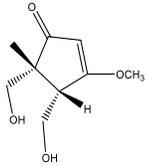
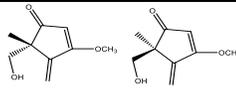
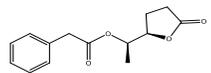
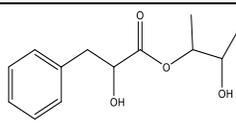
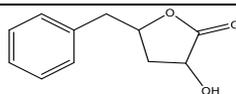
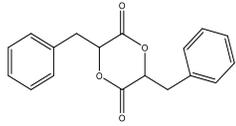
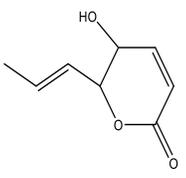
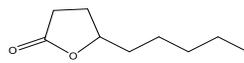
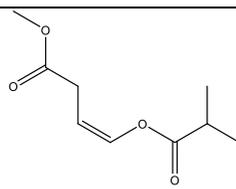
N. sphaerica HM-2 es considerada como una fuente importante de productos naturales activos (tabla 2), ya que presentan un rango extendido de actividades biológicas, tales como: i) antibacteriana [26], ii) larvicida [27], iii) anticancerígena [28], iv) antifúngica [29,30], y v) antiviral [31].

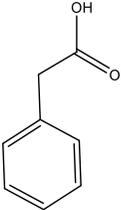
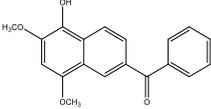
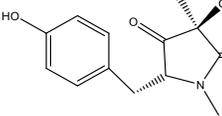
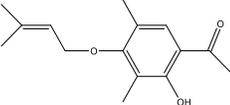
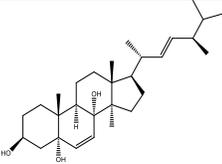
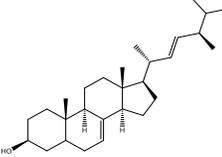
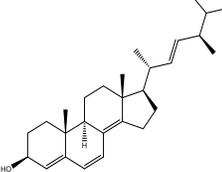
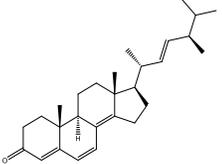
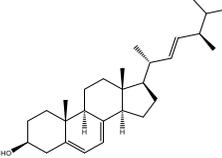
Tabla 2. Metabolitos secundarios aislados de *N. sphaerica* HM-2

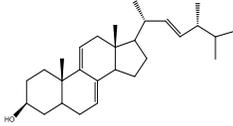
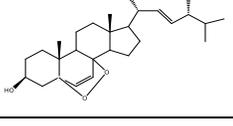
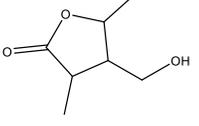
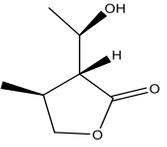
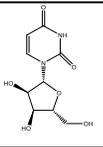
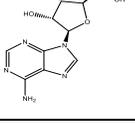
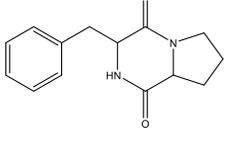
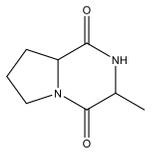
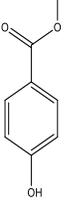
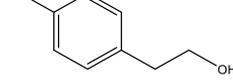
Metabolito	Fórmula estructural	Actividad biológica	m/z del compuesto	Referencia
3β-OH-dendocarbina A		Anticancerígeno	266.15	[32]
Dendocarbina-A		Anticancerígeno	251.16	[32,33]
Danilol		N.D	252.93	[32]
Isodrimenilol		Anticancerígeno	236.35	[32,33]
Bisaboiool oxido B		Antiinflamatorio	238.37	[32,34]
(3R,6E,10S)-2,6,10-trimetil-3-hidroxi-dodeca-6,11-dieno-2,10-diol		Anticancerígeno		[32,35]

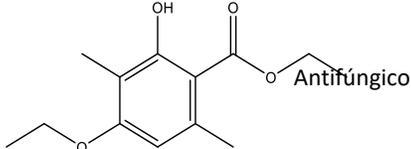
Fomalactona		Insecticida	157.08	[36]
Fomalactona		Insecticida	155.07	[36]
Acetilfomalactona		Insecticida	197.08	[36]
Vinblastina		Anticancerígeno	811	[28]
(+)-(2S,3S,4aS)- altenueno		Antiviral	292	[31]
(-)-(2R,3R,4aR)- altenueno		Antiviral	292	[31]
(-)-(2S,3S,4aR)- isoaltenueno		Antiviral	292	[31]
(+)-(2R,3R,4aS)- isoaltenueno		Antiviral	292	[31]
5'-metoxi-6-metil- bifenil-3,4,3'-triol		Antioxidante	247.09	[32,37]

Alternariol		Antiviral, anticancerígena, antimicrobiana	259	[31]
alternariol -9-metil eter		Antiviral, anticancerígena, antimicrobiana	273	[31]
4-hidroxialternariol-9-metil eter		N.D		[31]
(+) nigrosporaol		N.D	257.07	[38]
(-) nigrosporaol		N.D	257.07	[38]
Ácido alternarienónico		Fitotóxico	301.06	[38]
Epoxiexserohilona		N.D	450	[39]
3-(3,4-dihidroxifenil)-4,6,8-trihidroxil-1H-isochromeno-1-		Antifúngico	465.09	[27]
Afidicolina		Anticancerígeno, antiviral	338.5	[40–42]
Nigrosporina A		Antifúngico	185.08	[30]
Nigrosporina B		Antifúngico	187.09	[30]

Nigrosporina C		Antifúngico	187.09	[30]
Nigrosporina D		Antifúngico	169.08	[30]
1-(5-oxotetrahidrofuran-2-il)etil 2-fenilacetato		N.D	249,11	[43]
3-hidroxi-2-(2-hidroxi-3-fenilpropanoato)		N.D	239,12	[43]
harzialactona A		Anticancerígeno	192,97	[43,44]
1,4-dioxano-2,5-diona-3,6-bis(fenilmetil)-homopolymer		N.D		[43]
Fomalactona [(5R, 6R)-5 hidroxi-6-[(E)-prop-1-en-1-il]-5, 6-dihidroxi-2 h-piran-2-ona].		Antibacteriano, Antifúngico	154.06	[29,45]
5-pentildihidrofuran-2(3H)-ona		Antifúngico, anticancerígeno e inhibidor de la alfa-glucosidasa	156,22	[46]
(Z)-metil-4-(isobutiloxi)but-3-enoato,		Antifúngico, anticancerígeno e inhibidor de la alfa-glucosidasa	186,2	[46]

2-Ácido fenilacético		Antifúngico, anticancerígeno e inhibidor de la alfa- glucosidasa	136,15	[46]
Nigronaftafil		Antibacteriano, anticancerígeno, antiinflamatorio e inhibidor de la alfa- glucosidasa	322	[47]
Nigrosporamida A		Antifúngico e inhibidor de la alfa- glucosidasa	272,09	[48]
4-preniloxiclavato		Antifúngico	247,13	[48]
ergosta-6,22-dieno- 3b,5a,8a-triol		N.D	430.66	[27]
ergosta-7,22-dieno- 3b-ol		Anti-leishmaniasis	398.7	[27]
ergosta- 4,6,8(14),22- tetraeno-3b-ol		Anti-leishmaniasis	394.6	[27]
ergosta- 4,6,8(14),22- tetraeno-3ona		Anticancerígeno	392.6	[27]
ergosta-5(6),7,22- trieno-3b-ol		Anti-leishmaniasis	396.65	[27]

ergosta- 7,9(14),22- trieno-3b-ol		Anticancerígeno, antifúngico	396.65	[27]
ergosta-7,22-epi- dioxi-3b-ol		N.D	428.65	[27]
4-(hidroximetil)- 3,5- dimetil dihidrofuran-2(3H)- ona		Anticancerígeno	144.17	[27]
3-(1-hidroxietil)-4- methil dihidrofuran-2(3H)- ona		Anticancerígeno	144.17	[27]
Uridina			244.2	[27]
Adenosina			267.24	[27]
3- bencilhexahidropirr olo [1,2- a]pyrazina-1,4- diona		Antibacteriano, antioxidante	244.28	[27,49,50]
3-metilhexahidro pyrrolo[1,2- a]pyrazina-1,4- diona		Antioxidante	168.19	[27,50]
metil 4- hidroxibenzoato		Antibacteriano	152.15	[27]
4-(2-hidro- xyetil)fenol		N.D	138.16	[27]

Ácido esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Antiinflamatorio	284.48	[27]
Ácido oleico	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Antiinflamatorio	282.47	[27]
Ácido palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	N.D	256.43	[27]
Ácido mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	N.D	228.37	[27]
etil 4-etoxi-2-hidroxi-3,6-dimetilbenzoato		Antifúngico	239.12	[51]

Wu y colaboradores [30] aislaron una cepa de *N. sphaerica* HM-2 endófito de *Oxya chinensis*, la cual producía nigrosporinas, metabolitos que tienen actividad antifúngica contra fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum musae* y *Penicillium italicum*. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de nigrosporina (+) 1, nigrosporina (-) 1 y nigrosporina 2 van desde los 3.13 hasta 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra todos los patógenos descritos anteriormente. Nigrosporina 3 y nigrosporina (-) 4 presentan una CMI desde los 3.13 hasta 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *F. oxysporum*, *C. musae* y *P. italicum*. En cuanto, a nigrosporina (+4) los valores de CMI fueron de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *F. oxysporum*, *C. musae* y *F. graminearum*, respectivamente.

Además, este metabolito tenía una mayor actividad inhibitoria que Triademifon (control) a la misma concentración [30], un fungicida comercial utilizado en plantaciones de avena, cebada, manzano, sandía, pepino trigo, entre otros [52]. Por otro lado, Kim y colaboradores extrajeron fomolactona, un metabolito que es capaz de inhibir a hongos fitopatógenos como *Phytophthora infestans*, *P. capsici*, *Magnaporthe grisea*, *Corticium sasaki*, *Botrytis cinerea*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Puccinia recondita*, y *Erysiphe graminis* a una concentración de 2.5 mg/mL [29].

Recientemente, en la Amazonía ecuatoriana, un grupo de la asignatura de Ecología Microbiana (S1-2018) de la carrera de Ingeniería en Ecosistemas de la Universidad Regional

Amazónica Ikiam, aislaron dos cepas de hongos de muestras de suelo de un de un humedal de *Mauritia flexuosa* ubicado en Misahualli, Parroquia Puerto Misahualli, Provincia de Napo.

Posteriormente, un grupo de la asignatura de Micología Aplicada (S1-2019) de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la misma Universidad, procedieron a caracterizar e identificar molecularmente ambas cepas, las cuales correspondieron a *Trichotetum roseum* (HM1) y *Nigrospora sphaerica* (HM-2), respectivamente. Una vez identificadas las cepas aisladas y conocer sus posibles potencialidades biotecnológicas, se procedieron a realizar bioensayos de antagonismo contra diversas especies de hongos biocontroladores depositados en el Banco de Microorganismos de Ikiam. Los resultados cualitativos (Anexo 1) mostraron que *N. sphaerica* HM-2 es capaz de inhibir el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, *Lecanicillium lecanii*, *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* y de *Trichoderma viridae*, los cuales permitieron hipotetizar sobre el posible efecto antagonista de *N. sphaerica* HM-2 contra el agente causal de la moniliasis, el hongo *M. roleri*.

1.1.1.4. Enfoques biotecnológicos para mejorar la capacidad de inhibición de *N. sphaerica* HM-2 contra *M. roleri*

Desde el punto de vista biotecnológico, se pueden implementar diferentes estrategias para inducir la biosíntesis de compuestos antifúngicos y mejorar la capacidad antagonista de *N. sphaerica* HM-2 con propósitos de investigación o con fines comerciales y agroproductivos.

Con el propósito de investigación de las rutas biosintéticas *per sé*, se pueden utilizar diferentes estrategias para determinar la funcionalidad de los genes para establecer las posibles vías metabólicas asociadas a la síntesis del compuesto bioactivo que presenta capacidad inhibitoria contra *M. roleri*. La interrupción dirigida de genes biosintéticos y/o reguladores en *N. sphaerica* HM-2 mediante técnicas de recombinación homóloga o empleando el sistema CRISPR/Cas9, el estudio del efecto de dicha delección sobre su capacidad antagonista, y la posterior incorporación de estos genes interrumpidos en la cepa hospedadora para restaurar la capacidad de inhibición, pudieran contribuir a

determinar la función biológica de genes sobre la síntesis de los compuestos bioactivos sujetos a estudio [53].

Por otra parte, para incrementar el flujo metabólico del compuesto antifúngico en *N. sphaerica* HM-2, como estrategia, se pudiera incrementar el número de copias de genes biosintéticos con el reemplazo o no de promotores nativos por promotores constitutivos, inducibles o de expresión fuerte (de metabolismo secundario) que permitan incrementar los niveles de transcripción de los mismos. Cabe destacar que, debido al uso de marcadores de selección y/o de promotores fuertes, generalmente basados en ADN de especies foráneas a la cepa hospedadora (*N. sphaerica* HM-2), con esta estrategia se obtendrán organismos genéticamente modificados (OGM) [53].

Si se requiere obtener organismos editados genómicamente, es decir, o no-OGM, como estrategia, se pudieran utilizar herramientas para la edición de genomas basados en CRISPR/Cas9 para interrumpir de manera dirigida posibles genes reguladores negativos de la ruta la biosintética de interés [54]. Así mismo, se pudiera emplear el novedoso sistema dead Cas9 (dCas9) para inhibir la transcripción de dichos reguladores negativos.

Finalmente, y empleando como estrategia un enfoque más acoplado a la biotecnología clásica, se pudieran estudiar diferentes medios de cultivos (medios de fermentación en sustrato sólido o líquido), fuentes específicas de carbono, nitrógeno o fósforo, inductores, enmiendas o factores abióticos como la temperatura, pH, salinidad, concentración de oxígeno o dióxido de carbono, entre otros, que permitan regular y promover el crecimiento conjuntamente con la inducción de la biosíntesis de los compuestos antifúngicos en *N. sphaerica* HM-2, con lo cual no se aplicarían herramientas de ingeniería genética.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Ecuador, el 5% de la Población Económicamente Activa (PEA) subsiste gracias a las bondades del cacao, mientras que el 10% de la PEA establecida en zonas rurales, el cacao

se ha convertido en una pieza económica fundamental, sobre todo para numerosas familias que viven en las regiones Costa y Oriente [2].

Sin embargo, un 35% de la producción de cacao en Ecuador se ha visto afectada por la moniliasis [55], empleándose usualmente el control químico como estrategia para mitigar dicha enfermedad. Además de los efectos adversos que generan al ambiente y en la salud de los productores por su altos índices de toxicidad y contaminación [56], se conoce que el uso indiscriminado de agroquímicos promueven la resistencia de microorganismos fitopatógenos a estos compuestos [13].

Por otro lado, se conoce que el uso reiterado de agentes biocontroladores con un determinado mecanismo de acción como estrategia de control biológico, pudiera afectar en el tiempo su eficacia y, como consecuencia, aumentar el riesgo de desarrollar resistencia al biocontrolador [19]. Es por esto que, en muchos casos, las estrategias de control basadas en el manejo integrado de plagas y enfermedades no son eficientes para mitigar esta enfermedad por debajo al umbral de daño económico.

Como solución a dichos problemas, se propone como desafío estudiar y proponer nuevos medios de control biológico en el manejo integrado de la moniliasis en el cultivo del cacao. En este caso, se planteó estudiar la actividad antifúngica de *N. sphaerica* HM-2 y su posible efecto inhibitorio contra *M. royeri*, ya que no se ha demostrado su potencial antagonista ni tampoco se han aislado ni caracterizado los posibles metabolitos secundarios bioactivos asociados a dicha inhibición.

1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los metabolitos presentes en hongos provenientes de distintos tipos de hábitats presentan una variedad de actividades biológicas, incluidas el control de fitopatógenos [57,58]. Varios de esos compuestos han sido utilizados en el campo de la biomedicina, la agricultura, la tecnología de alimentos, la biorremediación ambiental y el sector industrial representando un tema de gran interés tanto en el área científica como comercial [59].

La tabla 1 muestra los microorganismos reportados con 100% de inhibición contra *M. roreri*. Sin embargo, la mayoría son cepas comerciales, generalmente de acceso limitado y que no poseen garantía de eficiencia, ya que las mismas han sido aisladas en diferentes regiones latitudinales y con características edafoclimáticas muy específicas [23]. Es por ello, que el estudio de las diversas especies de hongos biocontroladores depositados en el Banco de Microorganismos de Ikiam constituye un aporte trascendental para contribuir a resolver problemas de la región, en este caso, el control de hongos fitopatógenos en el cultivo de cacao empleando cepas autóctonas aisladas y caracterizadas en la región. Todo ello, considerando que este cultivo es el principal medio de subsistencia para numerosas familias que viven en zonas rurales las regiones Costa y Oriente.

Por esta razón, se planteó determinar la actividad antagonista de *N. sphaerica* contra *M. roreri* y analizar los posibles metabolitos secundarios asociados a dicha capacidad antifúngica. Los conocimientos derivados de la presente investigación permitirán diseñar nuevas alternativas biotecnológicas y amigables con el ambiente para el control de la moniliasis en el cultivo del cacao en Ecuador y la región latinoamericana.

1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo general

Caracterizar metabolitos secundarios con actividad antifúngica en *N. sphaerica* con potencial biotecnológico para el control del hongo fitopatógeno *M. roreri*.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Comprobar la actividad antagonista de *N. sphaerica* contra *M. roreri*.
2. Aislar y caracterizar de manera tentativa los metabolitos secundarios producidos por *N. sphaerica* que inhiben el crecimiento de *M. roreri*.
3. Determinar el porcentaje de inhibición de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* contra *M. roreri*.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Cepas, crecimiento y mantenimiento

La cepa *N. sphaerica* (figura 3a) fue aislada por un grupo de estudiantes de la asignatura de Ecología Microbiana (S1-2018) del suelo de un moretal (*Mauritia flexuosa*) en la localidad de Misahualli, Provincia de Napo, y almacenada en el Banco de Microorganismos del Grupo de Microbiología Aplicada de Ikiam. Posteriormente, estudiantes de la asignatura de Micología Aplicada (S1-2019), procedieron a extraer el ADN genómico de *N. sphaerica* HM-2 y secuenciar la región ITS para su debida identificación molecular.

Las cepas *M. roreri* Mr85, Mr50, Mr81, Mr93, Mr86, Mr56, Mr69, Mr47, Mr42, Mr72 y Mr95 fueron aisladas por investigadores del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (CIBE-ESPOL) y almacenadas en el Banco de Microorganismos de dicho laboratorio. En cuanto a las cepas *M. roreri* Inia1 e Inia2 (figura 3b), fueron donadas al Banco de Microorganismos de Ikiam por parte de la Estación Experimental Central de la Amazonía del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). En el Anexo 2 y 3, se detalla el lugar de procedencia de las cepas de *M. roreri* utilizadas en este trabajo de titulación.

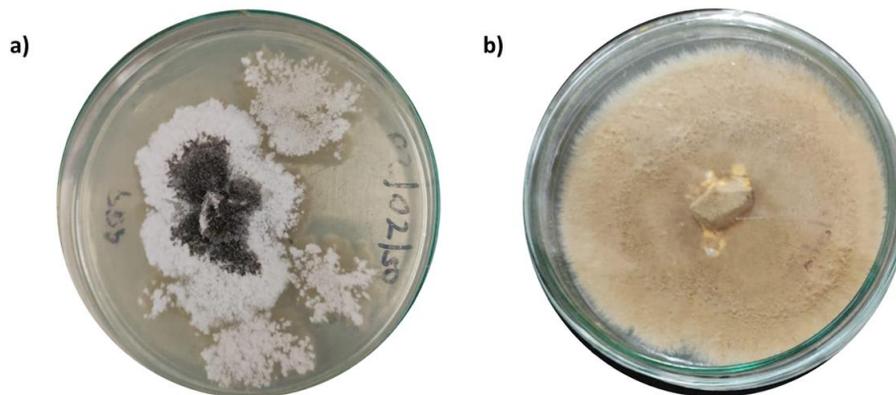


Figura 3. Placas madre en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) de a) *N. sphaerica* HM-2 y b) *M. roreri* Inia1

Para el crecimiento y mantenimiento del hongo *N. sphaerica* HM-2, a partir de cultivos axénicos en placa madre, se elaboraron placas de masa en medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) esterilizadas por 20 min a 121 °C y 15 psi en autoclave. Para esto, con la ayuda de un bisturí estéril, se procedió a colocar un disco de *N. sphaerica* HM-2 sobre medio de cultivo PDA contenido en placas de Petri y se incubaron a 28°C por 7 días. El mismo procedimiento se realizó para *M. roreri* (MR).

2.2. Ensayos de antagonismo de *N. sphaerica* HM-2 contra *M. roreri*

2.2.1. Tratamientos

Para evaluar el efecto de antagonismo de *N. sphaerica* HM-2 se realizaron bioensayos contra cada una de las 13 cepas de *M. roreri* estudiadas, las cuales se constituyeron en los tratamientos: Mr85, Mr50, Mr81, Mr93, Mr86, Mr56, Mr69, Mr47, Mr42, Mr72, Mr95, Inia1 e Inia2.

2.2.2. Diseño experimental

Los 13 tratamientos fueron evaluados de acuerdo al Diseño Completamente al Azar (DCA). La unidad experimental se conformó por una caja de Petri que contenía 20 mL de PDA con la inoculación de disco(s) de agar con micelio de 0.5 cm².

2.2.3. Metodología experimental

El ensayo de antagonismo se basó en la metodología de Villavicencio y colaboradores [23] con algunas modificaciones. Se realizaron cultivos duales de *N. sphaerica* HM-2-*M. roreri* en una misma caja Petri que contenía medio PDA. En este ensayo se colocó un disco de agar con micelio de *N. sphaerica* HM-2 a un lado de la placa mientras que al otro lado se inoculó un disco de agar con micelio de *M. roreri* (figura 4). Además, para contrastar el efecto antagonista de *N. sphaerica* HM-2 contra *M. roreri*, como control se sembraron en

placas Petri un disco de *M. roreri*. Posterior a la inoculación, se incubó por 10 días y se midió el crecimiento radial de *M. roreri*. Cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. La variable de respuesta fue la longitud del radio del micelio de *M. roreri*.



Figura 4. Esquema de cómo se realizó la siembra en los tratamientos

2.2.4. Evaluación del porcentaje de inhibición

Las placas fueron fotografiadas a los 7 días de incubación y estas imágenes fueron procesadas empleando el Software ImageJ para determinar el porcentaje de inhibición (%). El porcentaje de inhibición de *N. sphaerica* HM-2 contra *M. roreri* se calculó mediante la siguiente ecuación 1:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{R_c - R_e}{R_c} * 100 \quad (1)$$

En donde:

R_c: Radio de *M. roreri* crecido solo en la placa

R_e: Radio de *M. roreri* crecido en el enfrentamiento

2.2.5. Análisis estadístico

Los datos se procesaron estadísticamente en R y se observó que los datos tenían una distribución no normal. La normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza se comprobaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene con un nivel de significancia de 0.05, respectivamente. Además, se realizó análisis de varianza no paramétrico con un

nivel de significancia de 0.05 (Kruskal-Wallis). Por último, se realizó el test de Bonferroni con un nivel de significancia de 0.05. El script para realizar las pruebas de Shapiro-Wilks, Levene, Kruskal Wallis y Bonferroni se presentan en el Anexo 4. Las fórmulas de los estadísticos Shapiro-Wilks, Levene, Kruskal Wallis y Bonferroni se detallan a continuación:

Test de Shapiro-Wilks:

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

En donde:

$X_{(i)}$ es el número que ocupa la *i-ésima* posición en la muestra

\bar{x} es la media muestral

Test de Levene:

$$W = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k N_i (Z_i - Z)^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - Z_i)^2}$$

En donde:

W es el resultado de la prueba

k es el número de diferentes grupos a los que pertenecen a los grupos muestreados

N es el número total de casos en todos los grupos

Z_{ij} valor de la media para el *i-ésima* posición en el grupo

Prueba de Kruskal- Wallis:

$$K = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_i - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2}$$

En donde:

n_i es el número de observaciones en el grupo i

r_{ij} es el rango de la observación j en el grupo i

N es el número total de observaciones entre todos los grupos

$$\bar{r}_i = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} r_{ij}}{n_i}$$

$\bar{r} = \frac{N+1}{2}$ es el promedio de r_{ij}

Test de Bonferroni:

$$\alpha' = \frac{\alpha}{\text{número de grupos}}$$

En donde:

α = nivel de significancia

2.3. Crecimiento de biomasa de *N. sphaerica* HM-2 para la extracción de metabolitos secundarios

Para la producción de metabolitos secundarios se utilizó la metodología de Wu y colaboradores [30] con algunas modificaciones. Esporas frescas de *N. sphaerica* HM-2 se inocularon en fundas que contenían medio Czapek modificado cuya composición se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de medio Czapek con arroz como fuente de carbono

Reactivo	Cantidad [g]
Arroz	160
Fosfato disódico	0,24
Sulfato de magnesio	0,12
Nitrato de sodio	0,48
Cloruro de potasio	0,12
Sulfato ferroso	0,0024
Agua	55 mL

Para ello, se colocaron 160 g de arroz marca “Buscaditos” en cada funda. Posteriormente, se añadieron 55 ml de la solución Czapek sin la fuente de carbono ni agar. Se agitó vigorosamente para obtener una mezcla homogénea y se procedió a esterilizarlas en el autoclave (BIOBASE™). Posteriormente, se colocaron 4 discos de agar con micelio de 0,5 cm² *N. sphaerica* HM-2 en cada funda. Por último, las fundas se incubaron por 10, 20 y 30 días.

2.4. Extracción de metabolitos secundarios a partir de extractos crudos de *N. sphaerica* HM-2

Para la extracción de metabolitos secundarios de *N. sphaerica* HM-2 se utilizó la metodología de Wu y colaboradores [30] con algunas modificaciones. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el medio que contiene el arroz fermentado y el micelio se extrajo con etanol al 96 % en una proporción 1:1 durante dos días. Este proceso se repitió tres veces. Posteriormente, se decantó con gasas y se filtró con papel filtro y algodón. Por último, para concentrar los extractos, se evaporó el disolvente a 35°C y a una presión reducida de 90 mm Hg.

2.5. Preparación de los extractos

Los extractos crudos secos de cada tiempo de incubación fueron diluidos en 1.5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) hasta lograr una concentración de 1200, 133.33, 13.33, 3.33 mg/mL. De esta manera, se obtuvieron 12 extractos los cuales serán descritos a continuación en la tabla 4.

Tabla 4. Codificación de los extractos evaluados

Código	Tiempo de incubación	Concentración (mg/mL)
10días_1800mg	Extracto 10 días	1200
10días_200mg		133.33
10días_20mg		13.33
10días_5mg		3.33
20días_1800mg	Extracto 20días	1200
20días_200mg		133.33
20días_20mg		13.33
20días_5mg		3.33
30días_1800mg	Extracto 30días	1200
30días_200mg		133.33
30días_20mg		13.33

2.6. Evaluación de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2 contra *M. royeri*

2.6.1. Tratamientos

El presente ensayo se llevó a cabo con el análisis de 12 tratamientos. Cada tratamiento consistió en cada extracto obtenido de *N. sphaerica* HM-2 contra la cepa *M. royeri* INIA1.

2.6.2. Diseño experimental

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA). La unidad experimental se conformó por una caja de Petri que contenía 20 mL de medio de cultivo PDA suplementado con el extracto crudo a analizar con la inoculación de un disco de agar con micelio crecido de 0.5 cm². Por motivos de la pandemia COVID-19 y consecuente emergencia sanitaria, no se pudo realizar el diseño experimental con la cepa Mr95, la cual resultó ser la más susceptible ante *N. sphaerica* HM-2. Esto, debido a que dicho microorganismo es propiedad del CIBE-ESPOL y las Universidades públicas del Ecuador se encontraban cerradas al acceso público. Por lo tanto, se decidió continuar con el desarrollo de la presente investigación con la cepa INIA1 cedida por la Estación Experimental Central de la Amazonía del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

2.6.3. Metodología experimental

Para la evaluación del porcentaje de inhibición. Una vez esterilizado en autoclave el medio PDA, el medio de cultivo fue suplementado con los 12 diferentes extractos preparados en una proporción de 99 mL de PDA y 1 mL de extracto. Además, se añadió el tratamiento control de solvente que consistió en agregar 1 mL de DMSO en lugar del extracto y un control negativo en el que no se agregó ni solvente ni extracto. Posteriormente, se mezcló vigorosamente y se vertió 20 mL en cada caja Petri. Después, se colocó un disco de agar (0,5 cm²) con micelio de *M. royeri* en el centro de la caja y se incubó a 28 °C por 7 días.

Finalmente, se realizaron cinco réplicas por cada tratamiento para *M. roreri*. La variable de respuesta evaluada fue la medición del crecimiento del área micelial de *M. roreri*.

2.6.4. Evaluación del porcentaje de inhibición

A los 7 días, se realizó mediciones del área micelial de *M. roreri* mediante fotografías empleando el Software ImageJ. El porcentaje de inhibición se determinó mediante la ecuación 2.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_c - A_{me}}{A_c} * 100 \quad (2)$$

En Donde:

A_c : Crecimiento del área micelial de *M. roreri* en medio PDA

A_{me} : Crecimiento del área micelial de *M. roreri* en medio PDA suplementado con extracto

2.6.5. Análisis estadístico

Los datos se procesaron estadísticamente en R. La normalidad de los datos y la homogeneidad de la varianza se comprobaron mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene con un nivel de significancia de 0.05, respectivamente. Finalmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico con un nivel de significancia de 0.05 (Kruskal-Wallis). El script para realizar las pruebas de Shapiro-Wilks, Levene, Kruskal Wallis se presentan en el Anexo 4.

2.7. Tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2

El tamizaje fitoquímico (Anexo 5) de los extractos crudos obtenidos se realizó mediante la metodología propuesta por Shivaputrappa [60] para la presencia de alcaloides y glucósidos mientras que para fenoles, flavonoides, triterpenoides, esteroides, saponinas y taninos se realizó mediante el procedimiento de Harborne [61].

Test de alcaloides:

A 2 mg del extracto crudo de *N. sphaerica* HM-2, se le agregó 5 mL de agua destilada y posteriormente 2 mL de ácido clorhídrico hasta acidificar el medio. Luego, a esta solución se le agregó 1 mL del reactivo de Dragendorff. La formación de un precipitado rojo anaranjado indica la presencia de alcaloides.

Test de flavonoides y compuestos fenólicos:

A 5 mg de cada extracto disuelto en 2 mL de agua, se le agregó 3 gotas de FeCl_3 al 4 % (p/v). Si la disolución desarrolla una coloración negro-azulada indica la presencia de fenoles y si desarrolla una coloración verde indica la presencia de flavonoides.

Test de flavonoides:

A 5 mg de cada extracto disuelto en 2 mL de agua, se le agregó 3 gotas de NaOH al 2 % (p/v). Si la disolución desarrolla una coloración amarilla intensa que desaparece al añadir HCl diluido, revela la presencia de flavonoides.

Test de terpenoides:

A 2 mg de cada extracto crudo disuelto en CHCl_3 , se le adicionó 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo rojo en la interfase muestra terpenoides.

Test de taninos:

A 2 mL de extracto se le agregó 4 gotas de FeCl_3 al 4% (p/v). Un color verde indicará la presencia de galotaninos mientras que un color café indica la presencia de pseudotaninos.

Test de glucósidos:

A 2 mg de extracto disuelto en 5 mg de DMSO, se le agregó 4 gotas de FeCl₃ al 4% (p/v) y se homogenizó. Posteriormente, se le añadió ácido sulfúrico concentrado y formará dos capas. Si en la capa de abajo presenta un color rojizo y en la capa superior verde azulado indica la presencia de glucósidos.

2.8. Purificación de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2

La purificación de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2 se la realizó mediante la metodología de Mensor y colaboradores con algunas modificaciones [62]. Los extractos fueron disueltos en 50 mL de agua y particionados sucesivamente con los siguientes solventes: n-hexano y acetato de etilo con 3 porciones de 50 mL cada uno. Cada una de estas particiones se evaporaron a presión reducida de 100 mm Hg y a 35 °C. El diagrama de flujo en el que se muestra cómo se obtuvo cada extracto se presenta en el Anexo 6.

2.9. Cromatografía de capa fina

Los extractos crudos fueron resuspendidos en etanol 96% y se los analizó mediante Cromatografía de capa fina (CCF) usando como solventes hexano y acetato de etilo en las siguientes proporciones 3:1; 1:1; 1:3; y 85:15. Además, los reveladores utilizados fueron Luz UV = 254 nm; Luz UV= 365 nm y sulfato cérico al 20%. Posteriormente, se fotografiaron las placas y fueron procesadas mediante el programa ImageJ para determinar el factor de retención (Rf). El factor de retención se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Rf = \frac{\text{Distancia que recorre el analito desde la línea base}}{\text{Distancia de la línea del solvente}} \quad (3)$$

2.10. Caracterización de metabolitos secundarios de *N. sphaerica* HM-2 con propiedad antifúngica contra *M. royeri*

La caracterización de metabolitos secundarios se realizó a los extractos particionados a una concentración de 1 mg/mL mediante UHPLC-MS-QTOF. Las muestras fueron inyectadas en

una columna ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm 2.1 x 100 mm a una temperatura de 40 °C con un volumen de inyección de 10 microlitros. La fase móvil se conformó de un sistema binario compuesto por A: 99.99 % de agua MilliQ /0.01 % de ácido fórmico (Grado HPLC) y B: 99.99 % acetonitrilo (Grado HPLC) / 0.01 ácido fórmico (Grado HPLC). Se bombearon a una velocidad de 0,4 mL/min con un gradiente lineal comenzando con 95 % de A durante 13 minutos, seguido de 0 % A durante 1 min y por último 4 minutos en las condiciones iniciales.

Las corridas en el espectrómetro de masas se realizaron con una fuente de ionización por electrospray en un rango de masa de m/z 50-1600 Da en el modo positivo con una tensión capilar de 0,8 kV, caudal de gas de cono de 50 L/h, caudal de gas de desolvatación de 1200 L/h, temperatura de la fuente de 150 °C, temperatura de desolvatación de 550 °C con cono de muestreo y compensación de la fuente a los 40 y 80, respectivamente. Los experimentos de MS / MS se llevaron a cabo en conjunto con la colisión de rampa energía (CE): CE baja de 6 eV y CE alta de 30 a 80 eV. Los datos obtenidos (Anexos 7 - 11) fueron analizados con la biblioteca del equipo.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Ensayos de antagonismo

El test de Levene con un nivel de significancia de 0.05 determinó que el valor “F” fue de 0.9515 y el valor de $\text{Pr}(>F)$ 0.5151. El test de Shapiro Wilks con un nivel de significancia estableció que el valor de W fue de 0.84168 y el p-value de 6.879e-05. El test de Kruskal – Wallis con un nivel de significancia 0.05 determinó que el valor de chi-cuadrado fue de 29.391 y el p-value fue de 0.003446. De igual manera, el test de Bonferroni con un nivel de significancia de 0.05 permitió correlacionar entre qué tratamientos hay diferencias significativas (figura 5).

Se determinó la inhibición de 13 cepas de *M. roreri* cuando estas crecían en cultivo dual con *N. sphaerica* HM-2 en comparación a cuando crecían en cultivo axénico (control). Además, en los cultivos axénicos, se apreció un crecimiento radial de *M. roreri* mientras

que cuando las cepas fitopatógenas se enfrentaron a *N. sphaerica* HM-2 no presentaron esta característica (figura 6). En la figura 6 solo se presenta los tratamientos Mr50, Mr56, Mr93, Mr85, Mr69, Mr72 debido a problemas técnicos presentados de la cámara fotográfica del CIBE-ESPOL.

```
> shapiro.test(my_data$value)

      Shapiro-Wilk normality test

data:  my_data$value
W = 0.70077, p-value = 1.302e-07

> leveneTest(value ~ treatment, data = my_data)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 12  0.9515 0.5151
      26

> #Test Kruskal-Wallis no parametrico
> kruskal.test(value ~ treatment, data = my_data)

      Kruskal-Wallis rank sum test

data:  value by treatment
Kruskal-Wallis chi-squared = 35.952, df = 12, p-value = 0.0003299

> |

      Pairwise comparisons using t tests with pooled SD

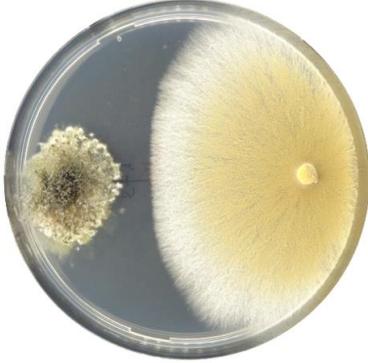
data:  my_data$value and my_data$treatment

      Inia1  Inia2  Mr42  Mr47  Mr50  Mr56  Mr69  Mr72  Mr81  Mr85  Mr86  Mr93
Inia2 0.41291 -      -      -      -      -      -      -      -      -      -
Mr42  2.2e-07 1.7e-06 -      -      -      -      -      -      -      -      -
Mr47  0.00518 0.03593 0.00048 -      -      -      -      -      -      -      -
Mr50  2.0e-06 1.7e-05 0.37084 0.00516 -      -      -      -      -      -      -
Mr56  0.00065 0.00532 0.00406 0.41841 0.03408 -      -      -      -      -      -
Mr69  2.2e-07 1.7e-06 1.00000 0.00048 0.37084 0.00406 -      -      -      -      -
Mr72  2.0e-06 1.7e-05 0.37084 0.00518 1.00000 0.03437 0.37084 -      -      -      -
Mr81  2.2e-07 1.7e-06 1.00000 0.00048 0.37084 0.00406 1.00000 0.37084 -      -      -      -
Mr85  0.00021 0.00190 0.01059 0.22622 0.08758 0.68559 0.01059 0.08826 0.01059 -      -      -
Mr86  0.00041 0.00376 0.00596 0.34306 0.05200 0.87319 0.00596 0.05244 0.00596 0.83761 -      -
Mr93  0.29397 0.82392 3.0e-06 0.06598 3.5e-05 0.01017 3.0e-06 3.5e-05 3.0e-06 0.00396 0.00607 -
Mr95  1.0e-13 2.8e-14 < 2e-16 1.3e-15 < 2e-16 4.5e-16 < 2e-16 < 2e-16 < 2e-16 < 2e-16 3.2e-16 3.9e-16 1.9e-14

P value adjustment method: BH
> |
```

Figura 5. Resultados estadísticos de las pruebas de Levene, Shapiro-Wilks, Kruskal-Wallis y Bonferroni para el ensayo de antagonismo de *N. sphaerica* HM-2 contra trece cepas de *M. roreri* de distintas localidades de Ecuador.

Tratamientos	Cultivo axénico (Control)	Cultivo dual (Enfrentamiento)
--------------	------------------------------	----------------------------------

<p>Mr50</p>		
<p>Mr56</p>		
<p>Mr93</p>		
<p>Mr85</p>		

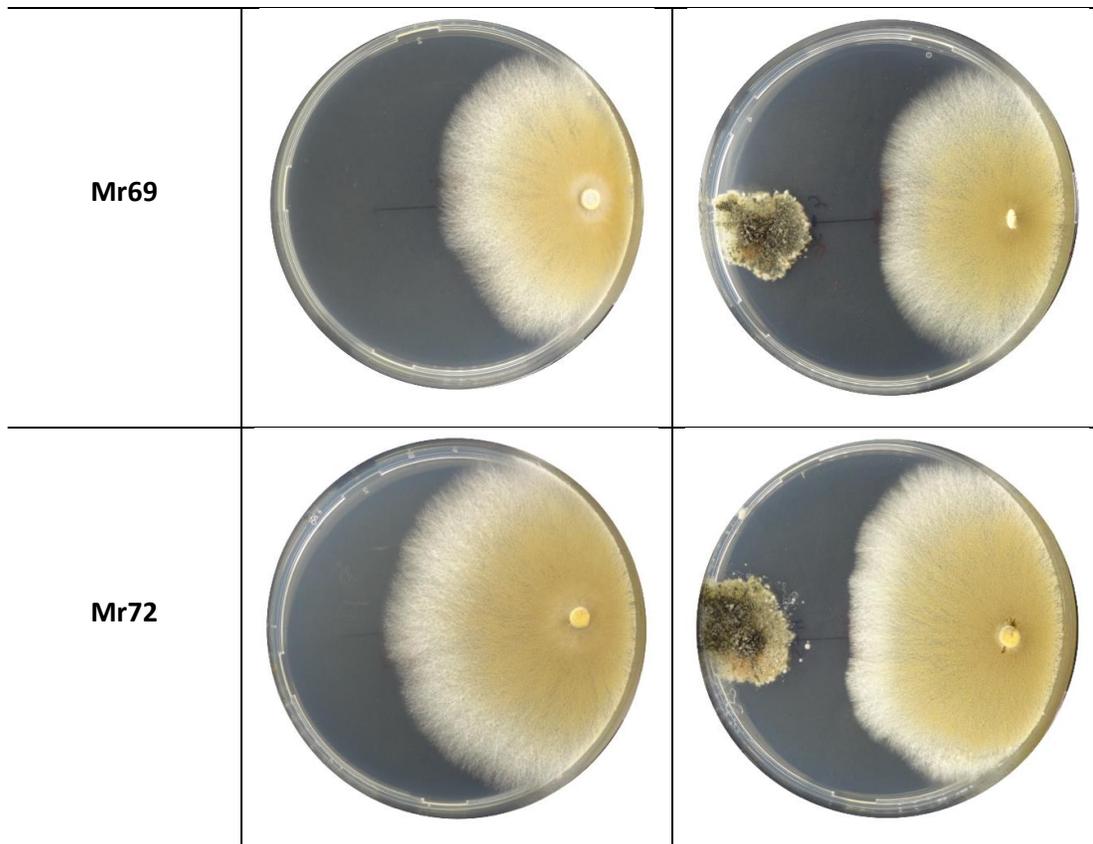


Figura 6. Ensayo de antagonismo de *N. sphaerica* HM-2 contra diferentes cepas de *M. royeri*.

En la tabla 5 se presentan los valores ponderados de la actividad antagónica de *N. sphaerica* HM-2 contra *M. royeri* a los 7 días de crecimiento, los cuales exhibieron desde 0 % hasta 61,9 % de inhibición.

Tabla 5. Porcentajes de inhibición de *N. sphaerica* HM-2 contra cepas de *M. royeri*.

Hongo antagonista	Cepa fitopatógena <i>M. royeri</i>	Porcentaje de inhibición
<i>N. sphaerica</i> HM-2	Mr81	0.00
	Mr42	0.00
	Mr69	0.00
	Mr50	2.72 ± 1.81
	Mr72	2.75 ± 0.9

	Mr85	7.91 ± 3.05
	Mr86	8.66 ± 1.04
	Mr56	9.25 ± 0.25
	Mr47	11.68 ± 4.49
	Mr93	17.26 ± 0.97
	Inia2	18.09 ± 2.45
	Inia1	20.58 ± 1.14
	Mr95	61.9 ± 1.34

3.2. Tamizaje fitoquímico y análisis en cromatografía en capa fina

La separación de compuestos realizados en placas de gel de sílice mostró diferencias con los distintos reveladores.

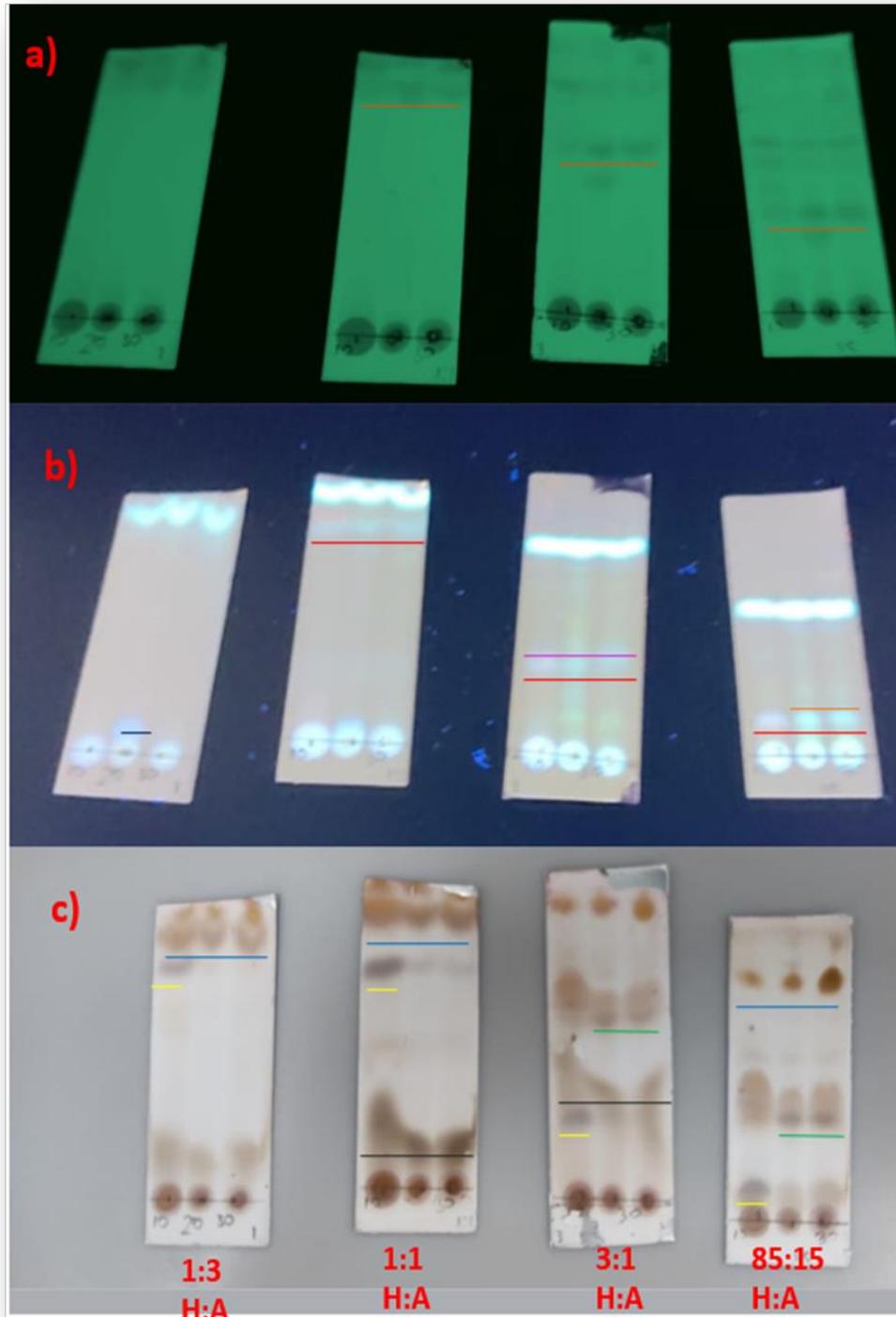


Figura 7. Separación de compuestos por Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2 utilizando como solventes hexano (H) y acetato de etilo (A). Los extractos 10, 20 y 30 días sembrados en ese orden de izquierda a derecha en cada placa. Las placas fueron reveladas: a) Bajo luz UV de 254 nm; b) Bajo luz UV de 365 nm y c) Con sulfato cérico al 20%.

Se puede observar una mayor presencia de compuestos en las placas cuando estas fueron reveladas en sulfato cérico al 20% seguido de luz UV de 365 nm y de 254 nm. Además, se identificó una buena separación de los diferentes compuestos de los extractos cuando se utilizó como fase móvil hexano: acetato de etilo a una proporción de 3:1 (figura 7).

En la tabla 6 se presenta los valores de factor de retención (Rf) de los compuestos separados con distintas fases móviles en los extractos de 10, 20 y 30 días usando diferentes reveladores.

Tabla 6. Cálculo del valor de factor de retención (Rf) en las placas con distintas fases móviles y reveladores

Extractos	Fase móvil	Reveladores		
		UV = 254 nm (Rf)	UV = 365 nm (Rf)	Sulfato cérico al 20% (Rf)
10 días	Hexano: Acetato de etilo 1:3	-	-	0.91; 0.78; 0.18
20 días		0.94	0.10	0.91; 0.18
30 días		0.94	-	0.91; 0.18
10 días	Hexano: Acetato de etilo 1:1	1.0	0.90	0.94; 0.74; 0.53; 0.28
20 días		1.0	0.90; 0.10	0.94; 0.53; 0.28
30 días		1.0	0.90	0.94; 0.53; 0.28
10 días	Hexano: Acetato de etilo 3:1	0.62	0.35	0.70; 0.39; 0.26
20 días		0.62; 0.53	0.75; 0.65; 0.45; 0.55; 0.35; 0.25; 0.12	0.70; 0.39;
30 días		0.62	0.35; 0.12	0.70; 0.39
10 días	Hexano: Acetato de etilo 85:15	0,69; 0.62; 0.40	0.13	0.87; 0.48; 0.10
20 días		0.69; 0.40	0.35; 0.13	0.87; 0.48; 0.10
30 días		0.69; 0.40	0.13	0.87; 0.48; 0.10

Bajo la luz UV=254 nm se observa el mismo compuesto para los tres días en Rf de 1.0; 0.62; 0.4 y 0.2 de acuerdo a la disminución en la concentración de acetato de etilo. Este compuesto se identifica bajo la luz UV de 365 nm, pero no bajo el sulfato cérico (subrayado

rojo, figura 7a y 7b). Por otra parte, bajo la luz UV=365 nm, a los 20 y 30 días se evidencia una mancha celeste a un $R_f = 0.35$ y $R_f = 0.13$ en las fases móviles 3:1 y 85:15 respectivamente que no se encuentra en los 10 días (subrayado naranja, figura 7b). El extracto de 10 días, en la fase móvil 3:1 se observa una mancha de color morado a un $R_f = 0.35$, el cual en la fase móvil 85:15 aparece a un $R_f = 0.13$ (subrayado gris, figura 7b).

En la revelación con sulfato cérico se evidencia una mancha gris a los 10 días en las diferentes fases móviles (subrayado amarillo, figura 7c) mientras que a los 20 y 30 días no se observa. Otro compuesto a un R_f diferente a los 20 y 30 días se evidencia en las placas (subrayado verde, figura 7c). Además, en este revelador se notó manchas en los 10, 20 y 30 días a un R_f de 0.28 (subrayado negro, figura 6c); y con $R_f = 0.59$ (subrayado rosa, figura 7c) que no corresponden al mismo compuesto. En cuanto al análisis fitoquímico realizado para los extractos 10, 20 y 30 días mostró la presencia de alcaloides, terpenos y taninos (tabla 7).

Tabla 7. Tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2 a los 10, 20 y 30 días de haber sido incubado.

Extractos crudos de <i>N. sphaerica</i> HM-2			
Prueba	10 días	20 días	30 días
Alcaloides	+	+	+
Flavonoides – Fenoles	-	-	-
Flavonoides	-	-	-
Terpenoides	+	+	+
Taninos	+	+	+
Glucósidos	-	-	-

* Presencia de compuestos

· Ausencia de compuestos

3.3. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2

Los extractos crudos en sus diferentes concentraciones fueron capaces de inhibir a la cepa *M. roreri* Inia1 a los 7 de incubación. El porcentaje de inhibición de los extractos 10días_1800mg, 20días_1800mg y 30días_1800mg resultó en 100 % a los 7 días. En cuanto

a 10días_200mg, 20días_200mg, 30días_200mg van desde 18 hasta 43% de inhibición a los 7 días. Con respecto a 10días_20mg, 20días_20mg, 30días_20mg, la inhibición varió desde los 8 hasta 23% en el día 7. Por último, los intervalos por parte de los extractos con menor concentración 10días_5mg, 20días_5mg, 30días_5mg a los 7 días se situaron en 5 hasta 10% de inhibición.

En la tabla 8 se presenta las diferentes concentraciones de extractos con los porcentajes de inhibición a los 7 días de incubación.

Tabla 8. Porcentajes de inhibición a las diferentes concentraciones de extracto

Concentración del extracto	Porcentaje de inhibición (%)
10días_1800mg	100
20días_1800mg	100
30días_1800mg	100
10días_200mg	22.55 ± 1.41
20días_200mg	41.42 ± 1.75
30días_200mg	15.35 ± 1.83
10días_20mg	14.97 ± 1.66
20días_20mg	18.20 ± 2.24
30días_20mg	6.83 ± 1.87
10días_5mg	6.68 ± 1.22
20días_5mg	11,54 ± 2.22
30días_5mg	4.82 ± 0.54

El test de Levene determinó que el valor “F” fue de 1.2603 y el valor de Pr(>F) 0.2759. El test de Shapiro Wilks determinó que el valor de W fue de 0.84168 y el p-value de 6.879e-05. El test de Kruskal – Wallis determinó que el valor de chi-cuadrado fue de 52.869 y el p-value fue de 1.896e-07 (figura 8).

```

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 11  1.2603 0.2759
      48
~

Shapiro-wilk normality test

data: aov_residuals
W = 0.84168, p-value = 6.879e-05

Kruskal-wallis rank sum test

data: value by treatment
Kruskal-wallis chi-squared = 52.869, df = 11, p-value = 1.896e-07

```

Figura 8. Resultados estadísticos de las pruebas de Levene, Shapiro-Wilks y Kruskal-Wallis para la actividad antifúngica de los extractos crudos

3.4. Caracterización de metabolitos secundarios

La identificación de los compuestos presentes en las particiones de hexano y acetato de etilo se lo realizó mediante el análisis de los cromatogramas de cada extracto (figura 9 y Anexos 7-11) y la biblioteca de medicina tradicional presente en el equipo UHPLC-MS-QTOF (Anexos 12-16).

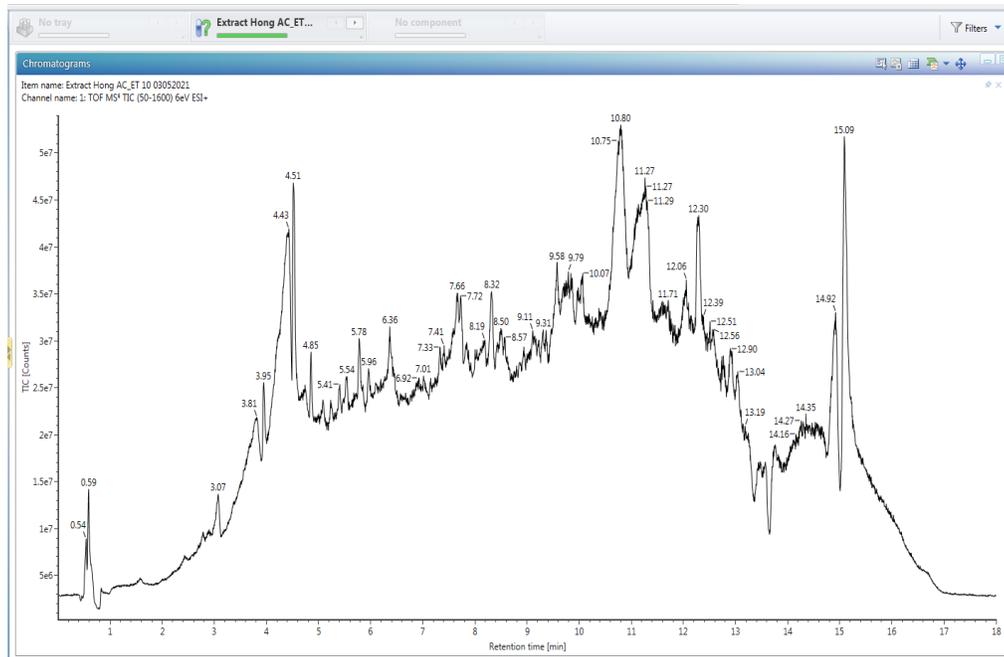


Figura 9. Cromatograma del extracto 20 días particionado con hexano. Visualización de un cromatograma a partir de la inyección de un extracto obtenido en el LC-MS

Los resultados de moléculas detectadas arrojaron más de 100 moléculas por lo que se filtró y se seleccionó moléculas con ppm < 3 y factor de respuesta > 5000. De esta manera, se permitió identificar en promedio 13 y 25 moléculas en las particiones de hexano y acetato de etilo, respectivamente (tablas 9 y 10). Además, se estableció de manera tentativa la presencia de 3 moléculas antifúngicas en la partición de hexano a los 10 y 30 días (Anexos 17-19). En cuanto, a la partición de Hexano_20días no se pudo analizar por problemas con la información generada.

Tabla 9. Metabolitos aislados de *N. sphaerica* HM-2 en las particiones de hexano.

Metabolito	Actividad Biológica	m/z observada	Aductos	Presencia en los extractos		
				Hexano_10d	Hexano_20d	Hexano_30d
Ciclo(Leu-Ile)	N.D	227.1752	[M+H]	Identificado	S.A	Identificado
Sorbitol	Diurético [63]	205.0686	[M + Na]	Identificado	S.A	Identificado
Ácido metilester	N.D	335.2926	[M + Na]	Identificado	S.A	-

Nonadecainoico						
Tenacigenina B	Anticancerígeno [64]	383.2432	[M+H]	Identificado	S.A	-
Meldenina	N.D	455.2785	[M+H]	Identificado	S.A	-
Ácido ganodérico H	Anticancerígeno [63]	573.3067	[M+H]	Identificado	S.A	Identificado
Procyanidina A2	Antibactericida, antiviral y antioxidante [63]	577.1331	[M+H], [M + Na]	Identificado	S.A	Identificado
Zeaxantina	Antioxidante [63]	591.4167	[M + Na]	Identificado	S.A	Identificado
Sericosido	Antibactericida [65]	667.4052	[M+H]	Identificado	S.A	-
Cimisida C	N.D	843.4749	[M+H], [M + Na]	Identificado	S.A	-
Vinaginsensida R1	N.D	865.4907	[M + Na]	Identificado	S.A	Identificado
Kaikasapomina III	N.D	927.5324	[M+H]	Identificado	S.A	Identificado
Octahidrocurcumina	Anticancerígeno [66]	399.1771	[M + Na]	-	S.A	Identificado
4-preniloxiclavato	Antifúngico [48]	247.1688	-	Tentativo	S.A	Tentativo
nigrosporamida A	Antifúngico [48]	272.1435	-	-	S.A	Tentativo
3-(3,4-dihidroxifenil)-4,6,8-trihidroxi-1H-iscromeno	Antifúngico [27]	465.2892	-	Tentativo	S.A	Tentativo

N.D: No descrito

S.A: Sin analizar

Tabla 10. Metabolitos aislados de *N. sphaerica* HM-2 en las particiones de Acetato de etilo

Metabolito	Actividad Biológica	m/z observada	Aductos	Presencia en los extractos		
				Acetato de etilo 10días	Acetato de etilo 20días	Acetato de etilo 30días
Ciclo(Leu-Ile)	N.D	227.1750	[M+H]	Identificado	Identificado	Identificado
Tenacinegina B	Anticancerígeno [64]	383.2432	[M+H]	Identificado	-	-
Cuasina	Larvicida [67]	388.1893	[M + Na]	Identificado	-	-
Ácido fitolacagénico	Antifúngico [68]	517.3515	[M+H]	Identificado	Identificado	Identificado
Evomonosido	Anticancerígeno [69], antiviral [70]	521.3104	[M+H]	Identificado	-	-
Procyanidina A2	Antibacterial, antiviral y antioxidante [63]	577.1331	[M+H], [M + Na]	Identificado	-	Identificado
Tiliosido	Antifúngico [71]	617.1258	[M + Na]	Identificado	Identificado	Identificado
Shengmanol-3-O- α -L-arabinopyranosido	Anticancerígeno [72]	621.3987	[M+H]	Identificado	Identificado	Identificado
Ginsenosido Rh4	Anticancerígeno [73]	643.4179	[M + Na]	Identificado	Identificado	-
Sericosido	Antibacterial [65]	667.4052	[M+H]	Identificado	Identificado	-
Vinangisenosido R1	N.D	865.4907	[M + Na]	Identificado	-	-
Kaikasapomina III	N.D	927.5324	[M+H]	Identificado	-	Identificado

Sorbitol	Diurético [63]	205.0686	[M + Na]	-	Identificado	-
Ácido metilester Nonadecanoico	N.D	335.2918	[M + Na]	-	Identificado	Identificado
d-Lirioferina	N.D	342.1693	[M+H]	-	Identificado	Identificado
Meldenina	N.D	477.2612	[M + Na]	-	Identificado	Identificado
11-Deoxi-23- acetato alisol b	N.D	499.3774	[M+H]	-	Identificado	-
Metil glicirretato	Anti- inflamatorio [63]	507.3438	[M + Na]	-	Identificado	-
B-Stigmasterol- 3-O-glucosido	Analgésico [74]	575.4307	[M+H]	-	Identificado	-
Pogostona	Antifúngico y antibacterial [75]	225.1121	[M+H]	-	Identificado	Identificado
Ácido hexacosil ester-ferúlico	Antioxidante [76]	581.4535	[M + Na]	-	-	Identificado
Ácido ganodérico H	Anticanceríge no [63]	573.3067	[M+H]	-	-	Identificado
Cimisida C	N.D	843.4749	[M+H], [M + Na]	-	-	Identificado
Filigenina	Antifúngico [63]	373.1832	[M+H]	-	Identificado	-

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayos de antagonismo

Los valores obtenidos en el test de Levene (Figura 5) determinaron que sí cumple con el supuesto de homogeneidad de varianzas debido a que el valor de probabilidad (p-value) no es menor que el nivel de significancia de 0.05. Esto significa que no hay evidencia que sugiera que la varianza entre grupos sea estadísticamente significativa por lo tanto hay

homogeneidad en los datos. En cuanto, a los valores presentes en el test de Shapiro-Wilks, se concluyó que no se cumple con el supuesto de normalidad en los datos. Por lo tanto, fue necesario utilizar el test no paramétrico Kruskal-Wallis, el cual permite conocer diferencias significativas entre los tratamientos, dónde los valores de chi-cuadrado fue de 35.592 y el p-value fue de 0.0003299 ($P < 0.05$). Esto indica que existe diferencia significativa en al menos en un tratamiento ya que el valor de probabilidad (p-value) es menor que el valor de chi-cuadrado ($P < 0.05$).

Por último, el test de Bonferroni permitió visualizar diferencias significativas con un nivel de significancia de 0.05 al tratamiento Mr95 con respecto a los demás tratamientos. Esto significa que existe una mayor actividad antagónica de *N. sphaerica* HM-2 contra la cepa de El Oro *M. royeri* Mr95 mostrando una inhibición del 61,9% (tabla 5). Con respecto a las otras cepas como Mr93, Inia1 e Inia2, los porcentajes de inhibición se aproximan a un 20%, mientras, que las cepas Mr81, Mr69 y Mr42 no son inhibidas por *N. sphaerica* HM-2 en las condiciones empleadas en esta investigación. En consecuencia, se sugiere realizar más estudios enfocados en la Provincia de El Oro con la cepa de *N. sphaerica* HM-2 en cuestión.

Los porcentajes de inhibición exhibidos por *N. sphaerica* HM-2 en este ensayo fueron similares a los obtenidos en otros trabajos reportados en la literatura muy recientemente. Por ejemplo, durante el desarrollo del presente trabajo de titulación, Villavicencio y colaboradores aislaron hongos endófitos de hojas sanas de cacao con la finalidad de emplearlos como controladores biológicos de enfermedades fúngicas de cultivos agrícolas. En este estudio, los autores reportaron una cepa de *N. sphaerica* que es capaz de producir metabolitos que inhiben un 25% del crecimiento de una cepa de *M. royeri* aislada de la Amazonía ecuatoriana [23]. De esta manera, el trabajo de Villavicencio y colaboradores junto con el presente trabajo de titulación, representan la primera evidencia de las propiedades antagónicas de *N. sphaerica* frente a *M. royeri*.

Así mismo, Villavicencio y colaboradores analizaron la capacidad antagonista de otras especies de hongos endófitos diferentes a *N. sphaerica*, obteniendo un rango de inhibición de la cepa *M. royeri* CIBE-A12.1 entre un 8% y 63%. La cepa que mostró la mayor actividad

de inhibición fue *Colletotrichum gloeosporioides* [23]. Esta especie se ha reportado previamente como agente causal de la antracnosis en diferentes cultivos de importancia económica como mango [77], papaya [78], guanábana [79], cacao [80], aguacate [81], entre otros.

En otro estudio [22] se reportó la capacidad de inhibición por antibiosis de distintas especies de *Trichoderma* ante *M. roreri*, las cuales presentaron un rango de inhibición de una cepa *M. roreri* aislada de Tabasco (México) entre 6.8% y 55.5%, en donde la más promisorio fue *T. asperellum* [22].

Los resultados obtenidos de esta investigación generados a partir de las 13 cepas de *M. roreri* provenientes de diversas regiones del Ecuador revela un claro efecto antagonista de la cepa *N. sphaerica* HM-2. Tal como se explicó en el apartado de Antecedentes, los mecanismos de acción por el cual ocurre el efecto antagónico entre microorganismos pueden ser por competencia de espacios y nutrientes, micoparasitismo y antibiosis [15,16]. En este caso, se puede observar un crecimiento lento de *N. sphaerica* HM-2 en las cajas Petri por lo que se descarta la competencia por espacio y/o nutrientes (figura 5). Además, el no contacto entre ambos micelios evidencia la no interacción de hifas entre estos dos microorganismos por lo que excluye el micoparasitismo (figura 5). Por otro lado, las zonas de inhibición resultantes en los cultivos duales (bioensayos de antagonismo) que se observan en la figura 5, sugieren que el mecanismo por el cual el hongo antagonista haya permitido reducir el crecimiento de *M. roreri* es la antibiosis. De hecho, el reporte descrito por Villavicencio y colaboradores reveló que el mecanismo de acción de *N. sphaerica* es la antibiosis [23].

4.2. Tamizaje fitoquímico y análisis en cromatografía en capa fina

La forma, el tamaño, la intensidad y el Rf de las manchas presentes en las placas son un indicativo de la presencia de compuestos en los extractos y permiten analizar sus características químicas [82]. Las manchas presentes en las placas permiten identificar

que hay más compuestos en el extracto del día 20 en comparación a los extractos de 10 y 30 días.

Bajo la luz UV = 254 nm se evidencian manchas con Rf similar en los 3 extractos por lo que se trataría del mismo compuesto presente en los tres intervalos de tiempo. Además, se puede observar que el mismo es un compuesto apolar debido a que mientras se aumenta la proporción de hexano en la fase móvil, este interactúa más con dicha fase. Bajo la luz UV= 365 nm en la fase móvil hexano: acetato de etilo 1:3, a los 20 días se examina una mancha azul con un Rf = 0.10 con características polares. En cuanto a los 10 días en la fase móvil 3:1 y 85:15 se detecta una mancha violeta a un Rf de 0.35 y 0., respectivamente, lo cual indica que es apolar (subrayado gris). Además, los Rf del extracto a los 20 días (figura 10a) revelados con luz UV = 365 nm tienen similitud con los Rf (figura 10b) obtenidos en las Cromatografías en capa fina realizadas por Wu y colaboradores [30], por lo que podría coincidir con las moléculas antifúngicas reportadas por ellos. A un valor de Rf igual a 0.36, 0.51 y 0.65 se reportaron los metabolitos Nigrosporina A (figura 11a), Nigrosporina C (figura 11c) y Nigrosporina B (figura 11b), respectivamente.

Si bien estas moléculas no se identificaron por LC-ESI en este estudio, pudieran estar presentes. No obstante, por motivos de emergencia sanitaria por Pandemia COVID-19, no se pudieron analizar la totalidad de los picos cromatográficos, ya que el procesamiento de estos datos requiere tiempos prolongados y el uso de un software que demanda equipos informáticos de alta capacidad de procesamiento. Con respecto a los experimentos de CCF mediante revelado con sulfato cérico, la mancha gris presente en los 10 días es un compuesto diferente a los que se detectan en las regiones de 20 y 30 días, sin embargo, no pudo ser identificado. Además, se evidencia un compuesto polar en los 3 extractos (subrayado rojo) y un compuesto apolar en los 20 y 30 días (subrayado verde).

Fase móvil: 3:1 Hexano: Acetato de etilo

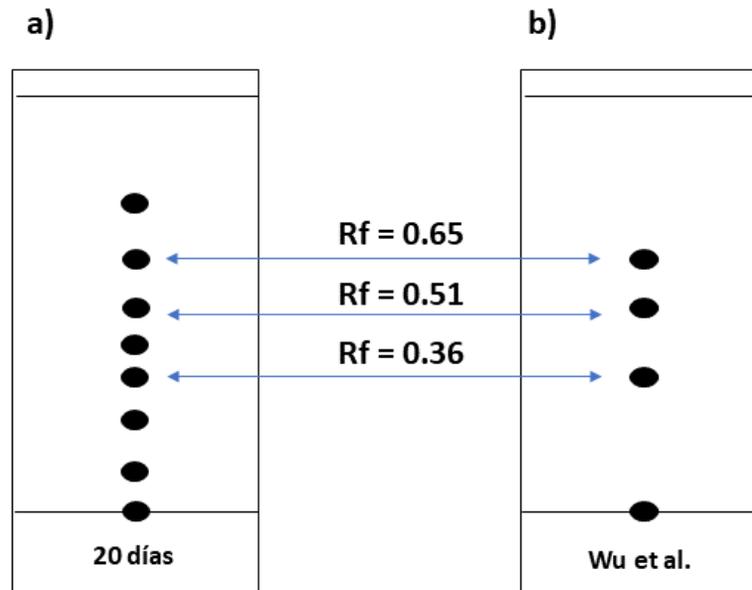


Figura 10. Comparación de Rf en placas reveladas en UV de los extractos a) 20 días y b) obtenidos por Wu y colaboradores [30]

Los reveladores también permiten asignarle una familia de compuestos a las manchas presentes en los extractos. Por ejemplo, las cetonas conjugadas, terpenoides y fenoles brillan en luz UV= 365 nm, en donde estos residuos estructurales se encuentran en compuestos como (-) nigrosporaol. En cuanto a compuestos fenólicos, como parte estructural de los metabolitos antifúngicos reportados por *N. sphaerica* HM-2, se encuentran 4-metil hidroxibenzoato, etil-4-etoxi-2hidroxi-3,6-dimetilbenzoato, nigrosporamida A. Cabe mencionar que éste último metabolito fue identificado tentativamente en la partición de hexano correspondiente al extracto de 30 días.

Con respecto a compuestos terpenoides se han aislado dendocarbinas de *N. sphaerica* HM-2 [32] y en este estudio las moléculas con esta naturaleza química que se determinaron fueron meldonina, zeaxantina, cuasina y Shengmanol-3-O- α -L-arabinopyranosida. De hecho, el análisis fitoquímico reveló la presencia de terpenoides,

alcaloides y taninos. Anteriormente se han reportado alcaloides en *N. sphaerica* HM-2 como la vinblastina [28].

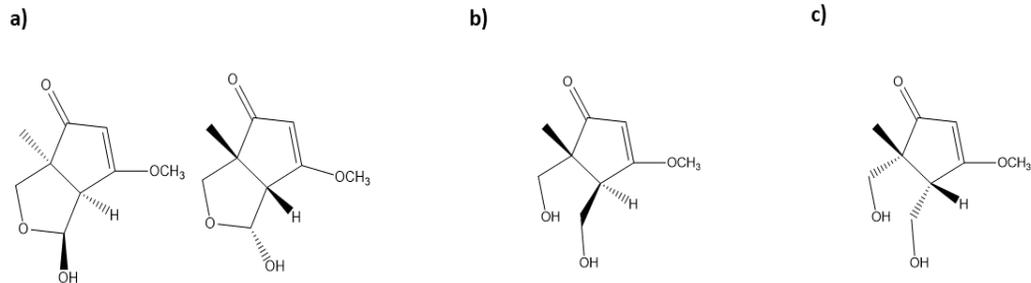


Figura 11. Estructuras de las moléculas antifúngicas reportadas por Wu y colaboradores: a) Nigrosporina A, b) Nigrosporina B y c) Nigrosporina C.

4.3. Actividad antifúngica de los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2

Los extractos obtenidos de *N. sphaerica* HM-2 en sus diferentes concentraciones fueron capaces de inhibir a la cepa fitopatógena de interés. Los valores obtenidos del test de Levene determinan que sí hay homogeneidad de varianzas mientras que el test de Shapiro-Wilks concluyó que no hay normalidad en los datos. Por lo tanto, se procedió a realizar un test no paramétrico Kruskal-Wallis, dónde los valores de chi-cuadrado fueron de 52.869 y el p-value fue de 1.896e-07. De esta manera, se observó que el valor de p (p-value) es menor que el valor de chi-cuadrado por lo que se concluyó que hay diferencias significativas en al menos uno de los tratamientos. De manera cualitativa, se evidenció que hay una tendencia sobre los porcentajes de inhibición en las diferentes concentraciones y días, en donde el extracto de los 20 días presenta una mejor inhibición en las concentraciones de 133.33, 13.33, 3.33 mg/mL (anexo 21).

Probablemente, este extracto presente una mayor cantidad o concentración de moléculas antifúngicas en comparación a los extractos de 10 y 30 días.

Los extractos a concentraciones evaluadas de 1333.33 mg/mL presentaron una inhibición del 100% en los tres diferentes tiempos de incubación mientras que los

extractos a menores concentraciones evaluadas fueron disminuyendo el porcentaje de inhibición. Esto se debe a que los extractos con 1333.33 mg/mL tienen una mayor concentración de compuestos antifúngicos en comparación a los extractos 133.33, 13.33, 3.33 mg/mL. Por lo tanto, se sugiere determinar la concentración de las moléculas antifúngicas presentes en cada extracto y la concentración óptima del extracto de *N. sphaerica* HM-2 para el control de *M. royeri*.

Los reportes de aislamiento de moléculas antifúngicas a partir de *N. sphaerica* HM-2 determinaron que fue en un rango de incubación de 30 hasta 40 días [27,30,48]. Con las metodologías empleadas en el presente estudio y con la cepa de *N. sphaerica* HM-2 amazónica ensayada, se estableció que, de acuerdo a los porcentajes de inhibición de los extractos, el mejor tiempo de incubación para la producción de moléculas antifúngicas es a los 20 días.

4.4. Análisis de metabolitos secundarios

El análisis de los cromatogramas y su respectiva comparación con la biblioteca del UHPLC-MS-QTOF permitió identificar las siguientes moléculas antifúngicas como ácido fitolacagénico, tilirósido, pogostona y filigenina, las cuales estas cuatro se encuentran en el extracto de 20 días. Por otro lado, el análisis de las estructuras, masas y sustituyentes permite caracterizar de manera tentativa las moléculas presentes en los extractos [83]. Es así como se caracterizó tentativamente la presencia de las siguientes moléculas antifúngicas en la partición de hexano 10 4-preniloxiclavato y 3-(3,4-dihidroxifenil-4,6,8-trihidroxi)-1H-isocromeno mientras que en la partición hexano 30 días se detectó las dos moléculas mencionadas anteriormente y nigrosporamida A.

Ácido fitolacagénico (figura 12a) es una sapogenina aislada de la planta *Chenopodium quinoa* Willd., la cual tiene actividad antifúngica con un MIC > 100 ug/mL [68]. Tilirósido (figura 12b), una molécula aislada de *Picea neoveitchii* presenta una actividad antifúngica moderada contra *Pyricularia grisea*, *Sclerotium rocsii* y *Alternaria mali* [71]. Pogostona (figura 12c), un metabolito secundario de la planta *Pogostemon cablin* Benth demostró una

fuerte actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Por último, filigenina (figura 12d) presenta actividad antifúngica contra el hongo *Cladosporium cucumerinum* a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [63].

En cuanto a las moléculas parcialmente determinadas (tentativas), 4-preniloxiclavato, nigrosporamida A son moléculas derivadas de acetofenona y pirrolidinona, respectivamente, las cuales fueron aisladas de *N. sphaerica* HM-2. Estos compuestos mostraron actividad antifúngica contra microorganismos como *F. oxysporium*, *C. musae* y *C. gloeosporioides*, hongos patógenos asociados a plantas de importancia económica [48]. Además, 3-(3,4-dihidroxifenil-4,6,8-trihidroxil)-1H-isocromeno, un compuesto isocromeno aislado de *N. sphaerica* HM-2 presentó actividad antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* con un valor de IC_{50} de 14.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [27].

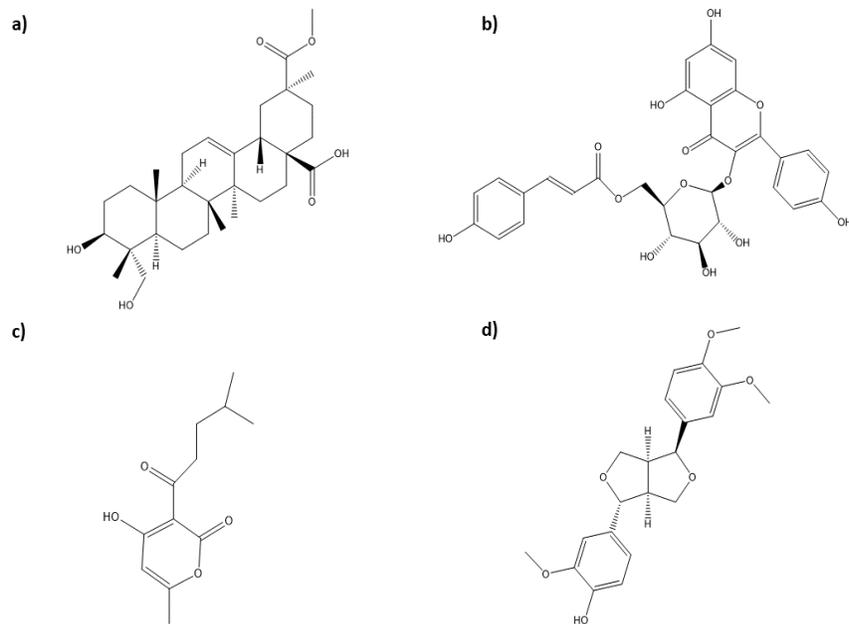


Figura 12. Estructuras de las moléculas antifúngicas encontradas de los extractos obtenidos

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La moniliasis en cultivos de cacao causa cuantiosas pérdidas económicas por lo que es mandatorio la realización de investigaciones que aporten posibles soluciones para el control de esta enfermedad. Entre las trece cepas de *M. royeri* provenientes de diferentes localidades de Ecuador sujetas a estudio, *N. sphaerica* HM-2 fue capaz de inhibir el crecimiento de diez. Las más susceptibles de este grupo, se encuentran Mr47 y Mr93 de la región Costa y las cepas amazónicas de *M. royeri* Inia1 y *M. royeri* Inia2 en un rango entre 11.68 y 21% a los 7 días en cultivo *in vitro*. Así mismo, la cepa Mr95 presentó una susceptibilidad de 61%, por lo que *N. sphaerica* HM-2 podría ser considerado como un hongo candidato en el diseño de estrategias de control biológico de *M. royeri* en la Provincia de El Oro.

Se planteó que el mecanismo de acción de *N. sphaerica* HM-2 es por antibiosis lo que estableció las bases para proponer la identificación de los metabolitos secundarios que mayoritariamente aportan al efecto inhibitorio. En este sentido, los resultados revelaron que los extractos crudos obtenidos de *N. sphaerica* presentaron un rango de inhibición entre 5% y 100% contra *M. royeri*, en donde se determinó que el extracto obtenido a los 20 días de incubación en SFES mostró los mejores porcentajes de inhibición en comparación a los extractos cosechados a los 10 y 30 días. Así mismo, el análisis por UHPLC-MS-QTOF de los extractos obtenidos permitió la identificación de 4 moléculas antifúngicas sintetizadas por *N. sphaerica* HM-2: ácido fitolacagénico, tilirósido, pogostona y filigenina. Además, se identificaron tentativamente 3 moléculas antifúngicas identificadas como 4-preniloxiclavato, nigrosporamide A y 3-(3,4-dihidroxifenil-4,6,8-trihidroxi)-1H-isocromeno.

5.2. Recomendaciones

Se ha descrito que los compuestos Nigrosporamida A y 4-preniloxiclavato son moléculas que presentan actividad antifúngica contra microorganismos patógenos de plantas de importancia económica. Por esta razón, se recomienda determinar si estas moléculas están presentes en el extracto crudo de la cepa amazónica *N. sphaerica* HM-2 y si son los que le confieren la actividad antifúngica contra las cepas del hongo fitopatógeno *M. roreri*. Para ello, se sugiere producir biomasa de *N. sphaerica* HM-2 en SFES a los 20 días de incubación en las condiciones de crecimiento descritas en la presente investigación y la purificación bioguiada de los extractos obtenidos. Así mismo, purificar las muestras e inyectarlas en el equipo de HPLC-MS del Laboratorio de Productos Naturales de Ikiam y comprobar de esta manera la presencia de los metabolitos mencionados anteriormente, usando parámetros estandarizados. Por otra parte, se recomienda realizar un análisis más exhaustivo de los cromatogramas usando una computadora de mayor capacidad de procesamiento para determinar otras moléculas antifúngicas que no hayan podido ser identificadas en los extractos purificados.

REFERENCIAS

1. Baratau P. Competitividad del cacao ecuatoriano. Estudio económico. Universidad Politécnica de Valencia. 2017.
2. Anecacao. Sector Exportador de Cacao. 2019.
3. Hardy F. Cacao manual. Inter-American Inst Agric Sci Turrialba, Costa Rica, 395p. 1960.
4. Jaimes Y, Aranzazu F. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). 2010. doi:10.21930/978-958-740-034-2
5. Pico J, Calderón D, Fernández F, Díaz A. Guía del manejo integrado de enfermedades del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L) en la Amazonía. 2012.
6. Aspiazu R. Crónicas de la Historia. Guayaquil, Ecuador: Biblioteca Municipal de

- Guayaquil; 2017.
7. Phillips-Mora W, Aime MC, Wilkinson MJ. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathol.* 2007;56: 911–922. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x
 8. Aime MC, Phillips-Mora W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia.* 2005. doi:10.1080/15572536.2006.11832751
 9. Sánchez-Mora F, Garcés-Fiallos F. *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans et al . en el cultivo de cacao. *Sci Agropecu.* 2012;3: 249–258.
 10. Correa Álvarez J, Castro Martínez S, Coy J. Estado de la biología de *Moniliophthora roreri* en Colombia Biology stage of *Moniliophthora roreri* in Colombia. *Acta Agronómica.* 2014;63: 1–23. doi:10.15446/acag.v63n4.42747
 11. Johnson J, Bonilla J, Aguero L. Manual de manejo y producción del cacaotero. Leon, Nicaragua; 2008.
 12. Villavivencio M, Jiménez M. Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica de *Moniliophthora roreri* aislados de cinco provincias de la Costa Ecuatoriana". CICYT. 2010.
 13. Tirado-Gallego PA, Lopera-Álvarez A, Ríos-Osorio LA. Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática. *Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu.* 2016;17: 417. doi:10.21930/rcta.vol17_num3_art:517
 14. Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, De los Santos-Villalobos S. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Rev Mex Fitopatol Mex J Phytopathol.* 2018. doi:10.18781/r.mex.fit.1706-5
 15. Campbell R. Biological Control of Microbial Plant Pathogens. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens.* 1989. doi:10.1017/cbo9780511608612
 16. Rubio SV, Fereres CA. Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos. *Ciencias Agrar.* 2005. doi:10.1061/40713(2004)75
 17. Infante D, Martinez B, Noyma G, Reyes Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma*

- frente a hongos fitopatogenos. Rev Prot Veg. 2009. doi:10.3917/espri.1507.0095
18. Ghorbanpour M, Omidvari M, Abbaszadeh-Dahaji P, Omidvar R, Kariman K. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases. Biological Control. 2018. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.11.006
 19. Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science. 2019. doi:10.3389/fpls.2019.00845
 20. Suárez LY, Rangel AL. Aislamiento de microorganismos para control biológico de *Moniliophthora roreri*. Acta Agron. 2014;62: 370–378.
 21. Garcés M. Evaluación de la actividad antagónica y quitinolítica de *Trichoderma* spp., para inhibir el crecimiento de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*. 2018.
 22. Reyes-Figueroa O, Ortiz-García CF, Torres-de la Cruz M, Lagunes-Espinoza L del C, Valdovinos-Ponce G. *Trichoderma* species from the cacao agroecosystem with biocontrol potential of *Moniliophthora roreri*. Rev Chapingo Ser Ciencias For y del Ambient. 2016. doi:10.5154/r.rchscfa.2015.08.036
 23. Villavicencio-Vásquez M, Espinoza-Lozano RF, Pérez-Martínez S, Sosa Del Castillo D. Foliar endophyte fungi as candidate for biocontrol against *moniliophthora* spp. of *theobroma cacao* (malvaceae) in Ecuador. Acta Biol Colomb. 2018. doi:10.15446/abc.v23n3.69455
 24. Cuervo-Parra J, Sanchez-Lopez V, Romero-Cortez T, Ramírez-Lepe M. *Hypocrea/Trichoderma viridescens* ITV43 with potential for biocontrol of *Moniliophthora roreri* Cif Par, *Phytophthora megasperma* and *Phytophthora capsici*. African J Microbiol Res. 2014. doi:10.5897/ajmr2013.6279
 25. Wang M, Liu F, Crous PW, Cai L. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora* : ubiquitous endophytes, plant and human pathogens . *Persoonia - Mol Phylogeny Evol Fungi*. 2017;39: 118–142. doi:10.3767/persoonia.2017.39.06
 26. Ibrahim D, Chai Lee C, Yenn TW, Zakaria L, Sheh-Hong L. Effect of the extract of endophytic fungus, *nigrospora sphaerica* cl-op 30, against the growth of ethicillin-resistant *staphylococcus aureus* (Mrsa) and *klebsiella pneumonia* cells. Trop J Pharm Res. 2015;14: 2091–2097. doi:10.4314/tjpr.v14i11.20

27. Metwaly AM, Kadry HA, El-Hela AA, Mohammad AEI, Ma G, Cutler SJ, et al. Nigrosphaerin A a new isochromene derivative from the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*. *Phytochem Lett.* 2014;7: 1–5.
doi:10.1016/j.phytol.2013.09.001
28. Ayob FW, Simarani K, Zainal Abidin N, Mohamad J. First report on a novel *Nigrospora sphaerica* isolated from *Catharanthus roseus* plant with anticarcinogenic properties. *Microb Biotechnol.* 2017;10: 926–932.
doi:10.1111/1751-7915.12603
29. Kim JC, Choi GJ, Park JH, Kim HT, Cho KY. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Manag Sci.* 2001;57: 554–559. doi:10.1002/ps.318
30. Wu Z, Xie Z, Wu M, Li X, Li W, Ding W, et al. New Antimicrobial Cyclopentenones from *Nigrospora sphaerica* ZMT05, a Fungus Derived from *Oxya chinensis* Thunber. *J Agric Food Chem.* 2018;66: 5368–5372. doi:10.1021/acs.jafc.8b01376
31. He JW, Chen GD, Gao H, Yang F, Li XX, Peng T, et al. Heptaketides with antiviral activity from three endolichenic fungal strains *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp. and *Phialophora* sp. *Fitoterapia.* 2012;83: 1087–1091. doi:10.1016/j.fitote.2012.05.002
32. Chen Z, Dong Z, Wen J, Feng T, Liu J. A new sesquiterpene from the endophytic fungus *nigrospora sphaerica* #003. *Rec Nat Prod.* 2016.
33. Sakio Y, Hirano YJ, Hayashi M, Komiyama K, Ishibashi M. Dendocarbins A-N, new drimane sesquiterpenes from the nudibranch *Dendrodoris carbunculosa*. *J Nat Prod.* 2001. doi:10.1021/np000639g
34. Miyazawa M, Nankai H, Kameoka H. Biotransformation of (-)- α -bisabolol by plant pathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. *Phytochemistry.* 1995. doi:10.1016/0031-9422(95)00130-Y
35. Phan NHT, Thuan NTD, Hien NTT, Huyen P Van, Duyen NHH, Hanh TTH, et al. Codojavanosides A-C, three new sesquiterpenoid glycosides from the roots of *Codonopsis javanica*. *Phytochem Lett.* 2020. doi:10.1016/j.phytol.2020.10.002
36. Meepagala K, Becnel J, Estep A. Phomalactone as the Active Constituent against Mosquitoes from *Nigrospora spherica*. *Agric Sci.* 2015;06: 1195–1201.
doi:10.4236/as.2015.610114

37. Wang QX, Bao L, Yang XL, Guo H, Yang RN, Ren B, et al. Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. *Fitoterapia*. 2012. doi:10.1016/j.fitote.2011.10.013
38. He JW, Wang CX, Yang L, Chen GD, Hu D, Guo LD, et al. A pair of new polyketide enantiomers from three endolichenic fungal strains *Nigrospora sphaerica*, *Alternaria alternata*, and *Phialophora* sp. *Nat Prod Commun*. 2016;11: 829–831. doi:10.1177/1934578x1601100633
39. Cutler HG, Hoogsteen K, Littrell RH, Arison BH. Epoxyxserohilone, a novel metabolite from *Nigrospora sphaerica*. *Agric Biol Chem*. 1991;55: 2037–2042. doi:10.1080/00021369.1991.10870928
40. Starratt AN, Loschiavo SR. The production of aphidicolin by *Nigrospora sphaerica*. *Can J Microbiol*. 2010;20: 416–417. doi:10.1139/m74-063
41. Pedrali-Noy G, Belvedere M, Crepaldi T, Focher F, Spadari S. Inhibition of DNA Replication and Growth of Several Human and Murine Neoplastic Cells by Aphidicolin Without Detectable Effect upon Synthesis of Immunoglobulins and HLA Antigens. *Cancer Res*. 1982;42: 3810–3813.
42. Bucknall RA, Moores H, Simms R, Hesp B. Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1973;4: 294–298. doi:10.1128/AAC.4.3.294
43. Zhang QH, Tian L, Zhou L Di, Zhang Y, Li ZF, Hua HM, et al. Two new compounds from the marine *Nigrospora sphaerica*. *J Asian Nat Prod Res*. 2009. doi:10.1080/10286020903339614
44. Chen B, Yin HF, Wang ZS, Xu JH. New synthesis of harzialactone A via kinetic resolution using recombinant *Fusarium proliferatum* lactonase. *Tetrahedron Asymmetry*. 2010. doi:10.1016/j.tetasy.2010.01.021
45. Ramesha KP, Mohana NC, Nuthan BR, Rakshith D, Satish S. Antimicrobial metabolite profiling of *Nigrospora sphaerica* from *Adiantum philippense* L. *J Genet Eng Biotechnol*. 2020. doi:10.1186/s43141-020-00080-4
46. Supaphon P, Preedanon S. Evaluation of in vitro alpha-glucosidase inhibitory, antimicrobial, and cytotoxic activities of secondary metabolites from the endophytic fungus, *Nigrospora sphaerica*, isolated from *Helianthus annuus*. *Ann*

- Microbiol. 2019. doi:10.1007/s13213-019-01523-1
47. Ukwatta KM, Lawrence JL, Wijayarathna CD. The study of antimicrobial, anti-cancer, anti-inflammatory and α -glucosidase inhibitory activities of Nigronaphphenyl, isolated from an extract of *Nigrospora sphaerica*. Mycology. 2019. doi:10.1080/21501203.2019.1620892
 48. Zhu X, Chen J, Zhu S, He Y, Ding W, Li C. Two new compounds from *Nigrospora sphaerica* ZMT05, a fungus derived from *Oxya chinensis* Thunber. Nat Prod Res. 2018. doi:10.1080/14786419.2017.1413566
 49. Renee Bina X, Taylor DL, Vikram A, Ante VM, Bina JE. *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo(Phe-Pro). MBio. 2013. doi:10.1128/mBio.00366-13
 50. Metwaly A, Kadry H, El-Hela A, Elsalam A, Ross S. New and antioxidant secondary metabolites from the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*. Planta Med. 2014. doi:10.1055/s-0034-1382391
 51. Ding W, Wu Z, Qin C, Xie J, Chen M, Li C. A New Phenolic Acid Derivative from an Insect-Derived Fungus *Nigrospora sphaerica* (Strain No. ZMT05). Chem Nat Compd. 2020. doi:10.1007/s10600-020-03165-1
 52. Plarquim. Triadimefon 25 WP.
 53. Naranjo-Briceño L, Rojas-Tortolero D, González H, Torres R, Zegarra N, Sena-D' L, et al. *Arthrospira platensis* como biofactoría de metabolitos secundarios de interés farmacológico : el ácido pipercolico . Rev Latinoam Biotecnol Ambient y Algal. 2010;1: 64–90.
 54. Mózsik L, Hoekzema M, de Kok NAW, Bovenberg RAL, Nygård Y, Driessen AJM. CRISPR-based transcriptional activation tool for silent genes in filamentous fungi. Sci Rep. 2021. doi:10.1038/s41598-020-80864-3
 55. González G. Alternativas orgánicas para el control de moniliasis (*Moniliophthora roreri*, Cif Par) en el cultivo de cacao. 2018.
 56. del Puerto Rodríguez AM, Suárez Tamayo S, Palacio Estrada DE. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2014.
 57. Frisvad JC. Fungal Chemotaxonomy. Biosynthesis and molecular genetics of fungal

- secondary metabolites. 2015. doi:10.1007/978-1-4939-2531-5_7
58. Zeilinger S, Martín J, García C. Biosynthesis and molecular genetics of fungal secondary metabolites. Springer; 2015.
 59. Zeilinger S, García-Estrada C, Martín J-F. Fungal Secondary Metabolites in the “OMICS” Era. 2015. doi:10.1007/978-1-4939-2531-5_1
 60. Shivaputrappa J,, G. M. V. Phytochemical and Antimicrobial evaluation of Endophytic *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn. *Asian J Pharm Pharmacol*. 2018. doi:10.31024/ajpp.2018.4.4.13
 61. Harborne JB. *Phytochemical Methods*. Second. Dordrecht: Springer Netherlands; 1984. doi:10.1007/978-94-009-5570-7
 62. Ho KY, Tsai CC, Chen CP, Huang JS, Lin CC. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phyther Res*. 2001. doi:10.1002/ptr.687
 63. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res*. 2016. doi:10.1093/nar/gkv951
 64. Xie B, Lu YY, Luo ZH, Qu Z, Zheng CG, Huang XA, et al. Tenacigenin B ester derivatives from *Marsdenia tenacissima* actively inhibited CYP3A4 and enhanced in vivo antitumor activity of paclitaxel. *J Ethnopharmacol*. 2019. doi:10.1016/j.jep.2019.02.028
 65. Anokwuru CP, Tankeu S, van Vuuren S, Viljoen A, Ramaite IDI, Taglialatela-Scafati O, et al. Unravelling the antibacterial activity of *terminalia sericea* root bark through a metabolomic approach. *Molecules*. 2020. doi:10.3390/MOLECULES25163683
 66. Zhang Z, Luo D, Xie J, Lin G, Zhou J, Liu W, et al. Octahydrocurcumin, a final hydrogenated metabolite of curcumin, possesses superior anti-tumor activity through induction of cellular apoptosis. *Food Funct*. 2018. doi:10.1039/c7fo02048a
 67. Evans DA, Kaleysa Raj R. Larvicidal efficacy of Quassin against *Culex quinquefasciatus*. *Indian J Med Res - Sect A Infect Dis*. 1991.
 68. Kuljanabagavad T, Wink M. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochem Rev*. 2009. doi:10.1007/s11101-009-9121-

0

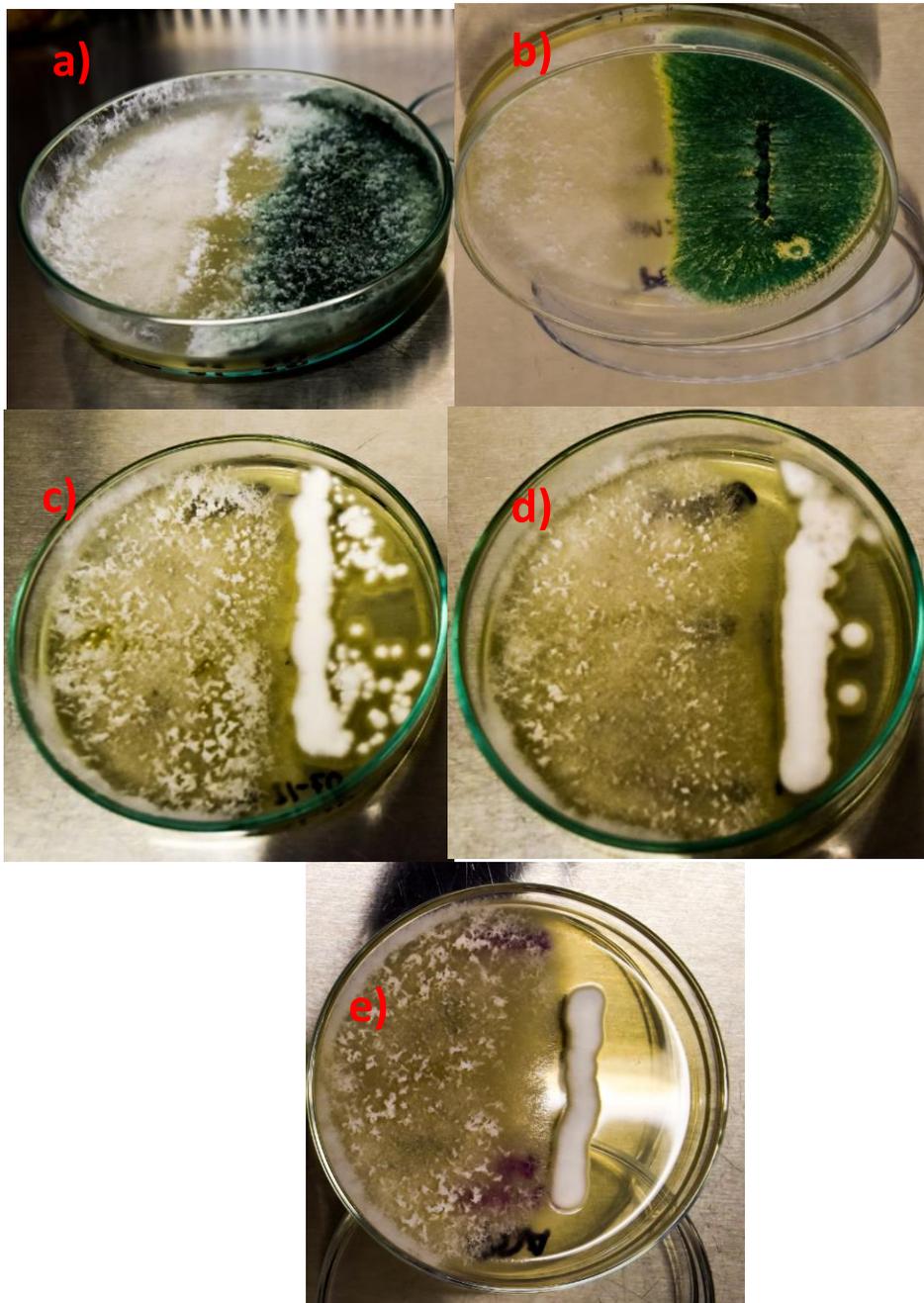
69. Delebinski CI, Georgi S, Kleinsimon S, Twardziok M, Kopp B, Melzig MF, et al. Analysis of proliferation and apoptotic induction by 20 steroid glycosides in 143B osteosarcoma cells in vitro. *Cell Prolif.* 2015. doi:10.1111/cpr.12208
70. Wangteeraprasert R, Lipipun V, Gunaratnam M, Neidle S, Gibbons S, Likhitwitayawuid K. Bioactive compounds from *Carissa spinarum*. *Phyther Res.* 2012. doi:10.1002/ptr.4607
71. Chen WQ, Song ZJ, Xu HH. A new antifungal and cytotoxic C-methylated flavone glycoside from *Picea neoveitchii*. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2012. doi:10.1016/j.bmcl.2012.07.089
72. Nian Y, Wang HY, Zhou L, Su J, Li Y, Qiu MH. Cytotoxic cycloartane triterpenes of the traditional Chinese medicine “shengmao” (*Cimicifuga dahurica*). *Planta Med.* 2013. doi:10.1055/s-0032-1328019
73. Wu Q, Deng J, Fan D, Duan Z, Zhu C, Fu R, et al. Ginsenoside Rh4 induces apoptosis and autophagic cell death through activation of the ROS/JNK/p53 pathway in colorectal cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2018. doi:10.1016/j.bcp.2017.12.004
74. Shehab NG, Mahdy A, Khan SA, Nouredin SM. Chemical constituents and biological activities of *Fagonia Indica burm F.* *Res J Med Plant.* 2011. doi:10.3923/rjmp.2011.531.546
75. Yi YY, He JJ, Su JQ, Kong SZ, Su JY, Li YC, et al. Synthesis and antimicrobial evaluation of pogostone and its analogues. *Fitoterapia.* 2013. doi:10.1016/j.fitote.2012.11.005
76. Delazar A, Shoeb M, Kumarasamy Y, Byres M, Nahar L, Modarresi M, et al. Two bioactive ferulic acid derivatives from *Eremostachys glabra*. *Daru.* 2004.
77. Rondón O, Sanabría de Albarracín N, Rondón A. Respuesta in vitro a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., en frutos de mango. *Agron Trop.* 2006.
78. Zavala-León MJ, Tun-Suárez JM, Cristóbal-Alejo J, Ruiz-Sánchez E, Gutiérrez-Alonso O, Vázquez-Calderón M, et al. CONTROL POSTCOSECHA DE LA ANTRACNOSIS EN PAPAYA Y SENSIBILIDAD DE *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. A FUNGICIDAS ORGANOSINTÉTICOS. *Rev Chapingo Ser Hortic.* 2005.

doi:10.5154/r.rchsh.2004.03.019

79. Álvarez E, Ospina CA, Mejía JF, Llano G. Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el valle del cauca. *Fitopatol Colomb*. 1998.
80. Maximova SN, Marelli JP, Young A, Pishak S, Verica JA, Guiltinan MJ. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta*. 2006. doi:10.1007/s00425-005-0188-6
81. Trinidad-Ángel E, Ascencio-Valle FDJ, Ulloa OA, Ramírez-Ramírez OC, Ragazzo-Sánchez JA, Calderón-Santoyo M, et al. Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. *Rev Mex Ciencias Agrícolas*. 2017. doi:10.29312/remexca.v0i19.664
82. Skoog DA, West DM, Holler J, Crouch SR. Fundamentos de química analítica. *Fundamentos de química analítica*. 2015.
83. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environmental Science and Technology*. 2014. doi:10.1021/es5002105

ANEXOS

Anexo 1. Ensayos de antagonismo de *N. sphaerica* HM-2 contra diferentes especies biocontroladoras: a) *Trichoderma harzianum*, b) *Trichoderma viridae*, c) *Beauveria bassiana*, d) *Paecilomyces lilacinus* y e) *Lecanicillium lecanii*



Anexo 2. Localización del aislamiento de las cepas de *M. roreri* utilizadas en el trabajo de titulación. En esta investigación se usó 13 cepas de *M. roreri* para los ensayos de antagonismo mientras que para la actividad antifúngica se utilizó Inia1.

Cepa	Especie	Localidad-Provincia de aislamiento
Mr95	<i>Moniliophthora roreri</i>	Arenillas, El Oro
Mr85	<i>Moniliophthora roreri</i>	Pastaza, Pastaza
Mr50	<i>Moniliophthora roreri</i>	Lago Agrio, Sucumbíos
Mr81	<i>Moniliophthora roreri</i>	Tiwintza, Morona Santiago
Mr93	<i>Moniliophthora roreri</i>	Santa Rosa, El Oro
Mr86	<i>Moniliophthora roreri</i>	Milagro, Guayas
Mr56	<i>Moniliophthora roreri</i>	Lago Agrio, Sucumbíos
Mr69	<i>Moniliophthora roreri</i>	Loreto, Orellana
Mr47	<i>Moniliophthora roreri</i>	Vinces, Los Ríos
Mr42	<i>Moniliophthora roreri</i>	Nangaritza, Zamora Chinchipe
Mr72	<i>Moniliophthora roreri</i>	Archidona, Napo
Inia1	<i>Moniliophthora roreri</i>	Joya de los Sachas, Orellana
Inia2	<i>Moniliophthora roreri</i>	Joya de los Sachas, Orellana

Anexo 3. Localización espacial del aislamiento de las cepas de *M. roreri* utilizadas en el trabajo de titulación. En esta investigación se usó 13 cepas de *M. roreri* para los ensayos de antagonismo mientras que para la actividad antifúngica se utilizó Inia1.



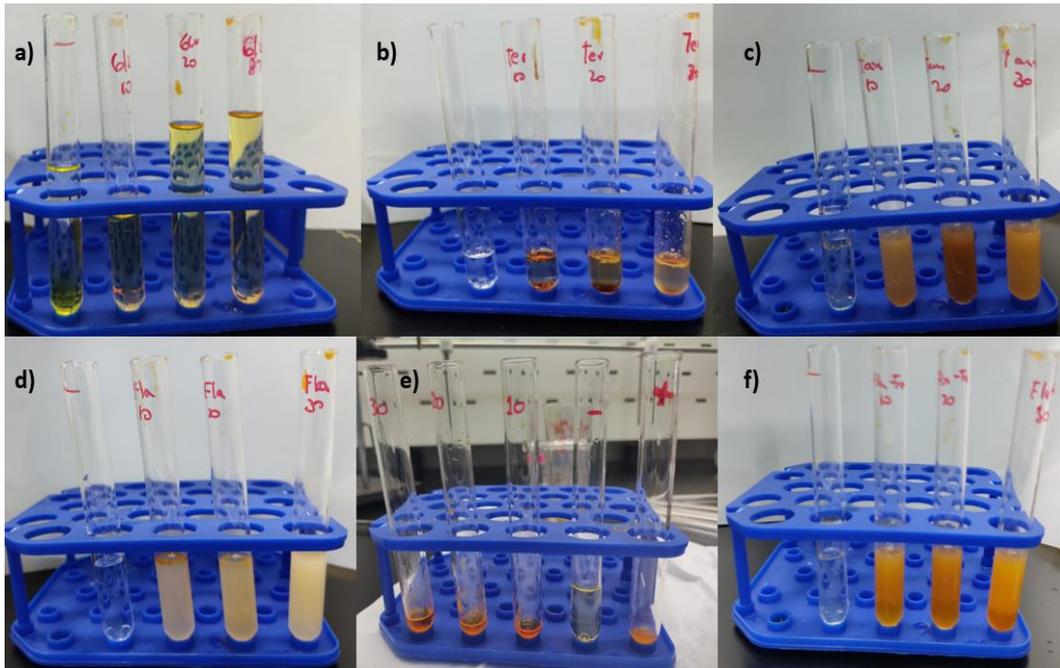
Anexo 4. Script para el análisis estadístico de las pruebas Shapiro-Wilks, Levene, Kruskal Wallis. Los ensayos descritos anteriormente fueron realizados en R y a continuación se visualiza el script.

```

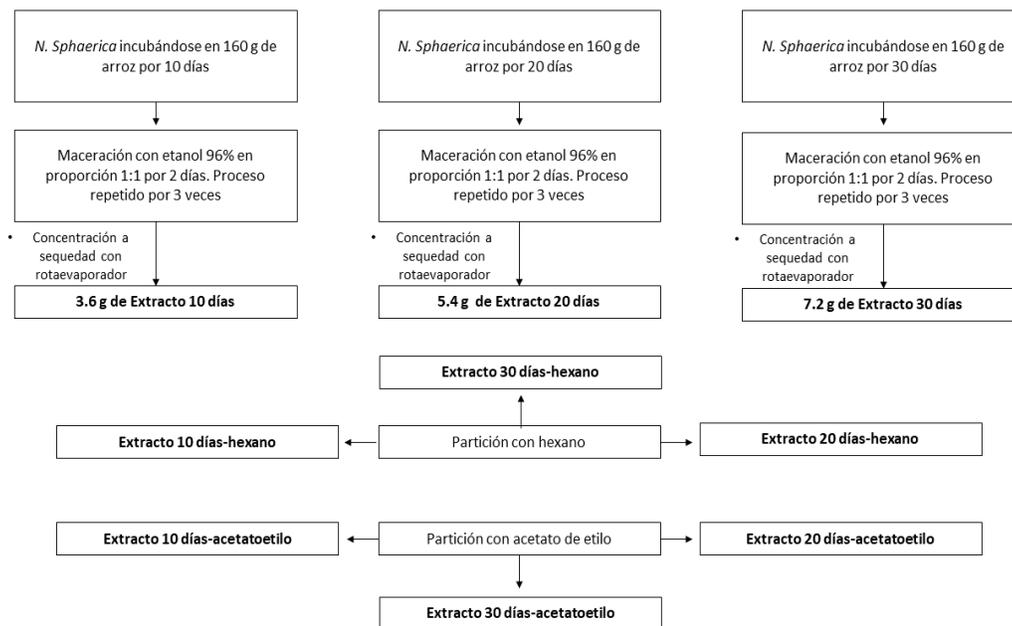
3 library(readr)
4 library(car)
5 #Database
6 db <- read_csv2("C:\\Users\\Stalin\\Downloads\\InhibicionNigrosextractos.csv")
7
8 #Convierto la variable treatment en factor
9 db$treatment <- factor(db$treatment, levels = levels(factor(db$treatment)))
10
11 #Comprobación de supuestos:
12 #1- Homogeneity of variances
13 plot(res.aov, 1) #Observación 22, 25 y 2 pueden considerarse como datos atípicos.
14 #Estas obs pueden afectar la hom y norm de varianzas.
15
16 leveneTest(value, group = treatment, data = db) #Pr>0.05; por tanto, hay hom de varianzas
17
18
19 #2-Normality of variances
20 plot(res.aov, 2)#Observación 22, 25 y 2 pueden considerarse como datos atípicos.
21 #Estas obs pueden afectar la hom y norm de varianzas.
22 |
23 # Extract the residuals
24 aov_residuals <- residuals(object = res.aov )
25
26 # Run Shapiro-wilk test
27 shapiro.test(x = aov_residuals) #No existe normalidad en los datos
28
29 #Test kruskal-wallis no parametrico
30 kruskal.test(value ~ treatment, data = db)
31 |

```

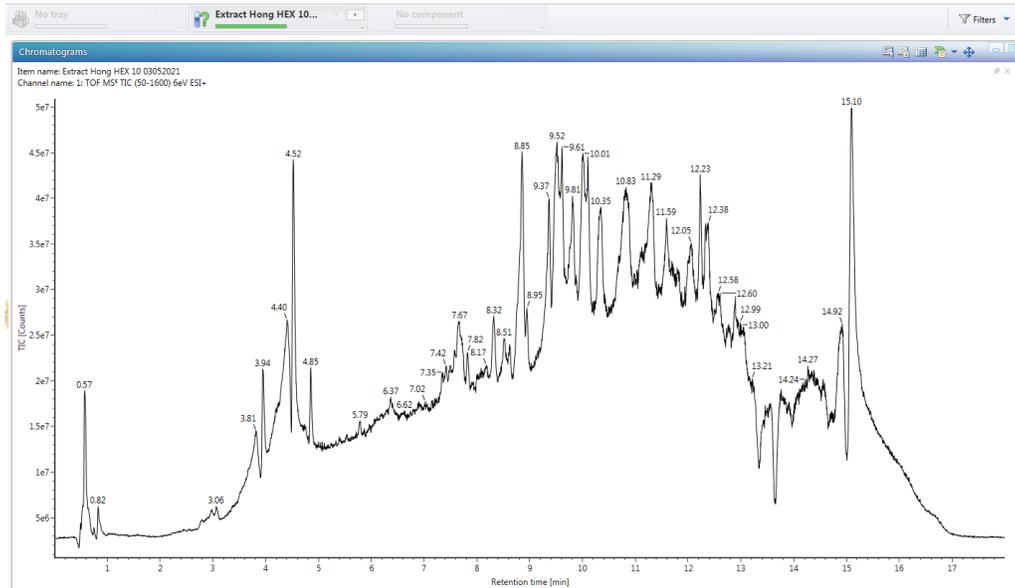
Anexo 5. Tamizaje fitoquímico para la detección de compuestos a) glucósidos, b) terpenoides, c) taninos, d) flavonoides, e) alcaloides y f) fenoles y flavonoides



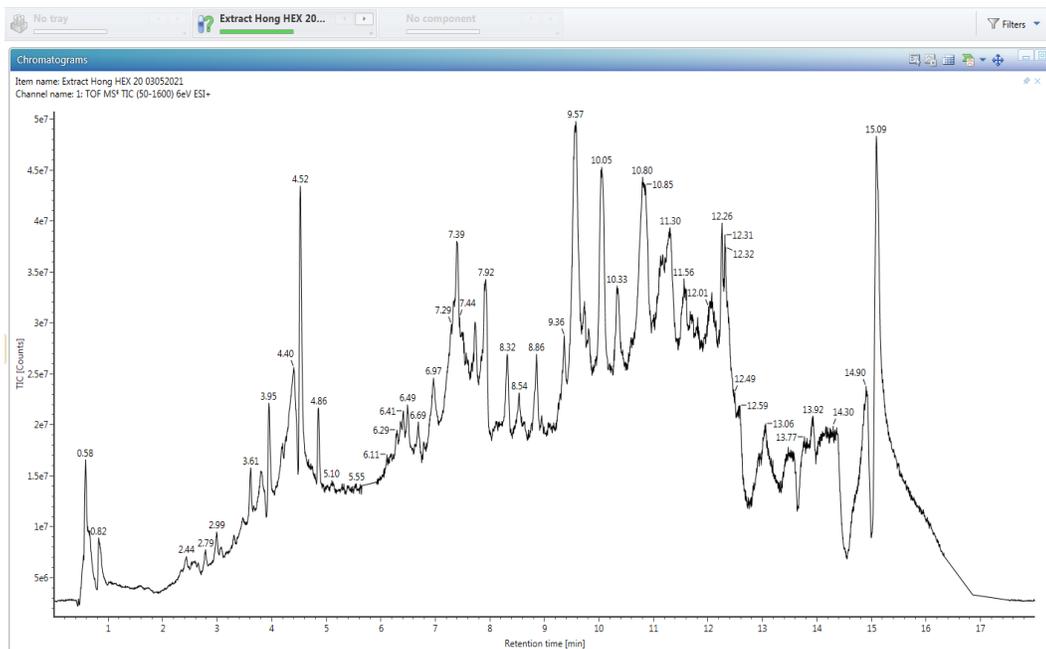
Anexo 6. Diagrama de flujo de los extractos obtenidos. Se fermentó a *N. sphaerica* HM-2 en diferentes tiempos de incubación y posteriormente se realizaron las extracciones y particiones para futuros análisis como actividad biológica o actividad antifúngica.



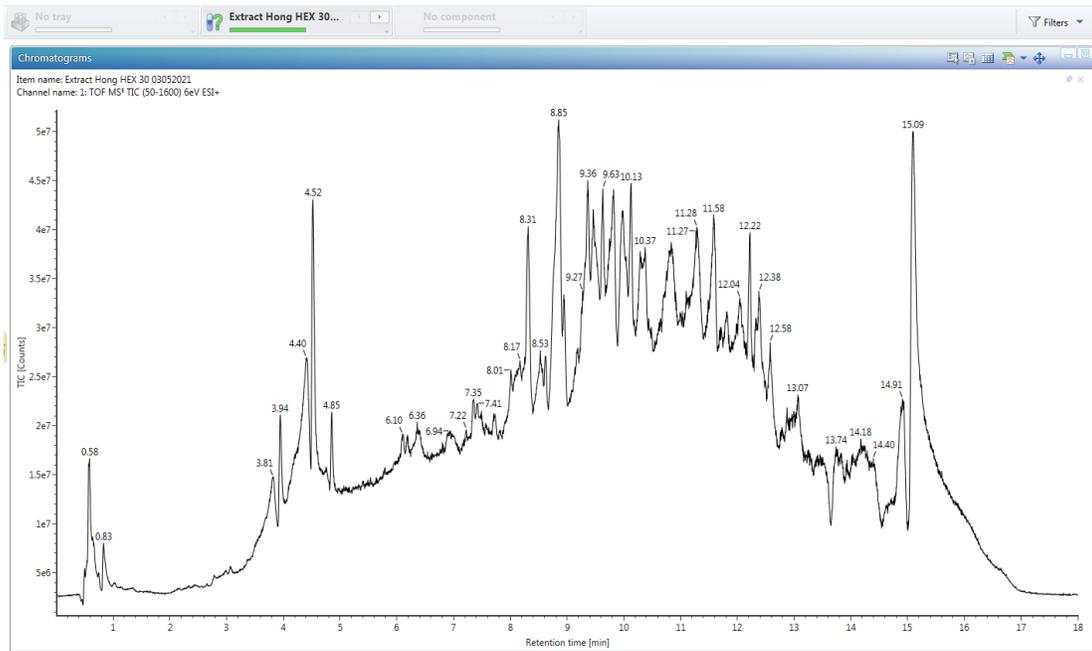
Anexo 7. Cromatograma del extracto 10 días particionado con hexano. Visualización de un cromatograma a partir de la inyección de un extracto obtenido en el LC-MS.



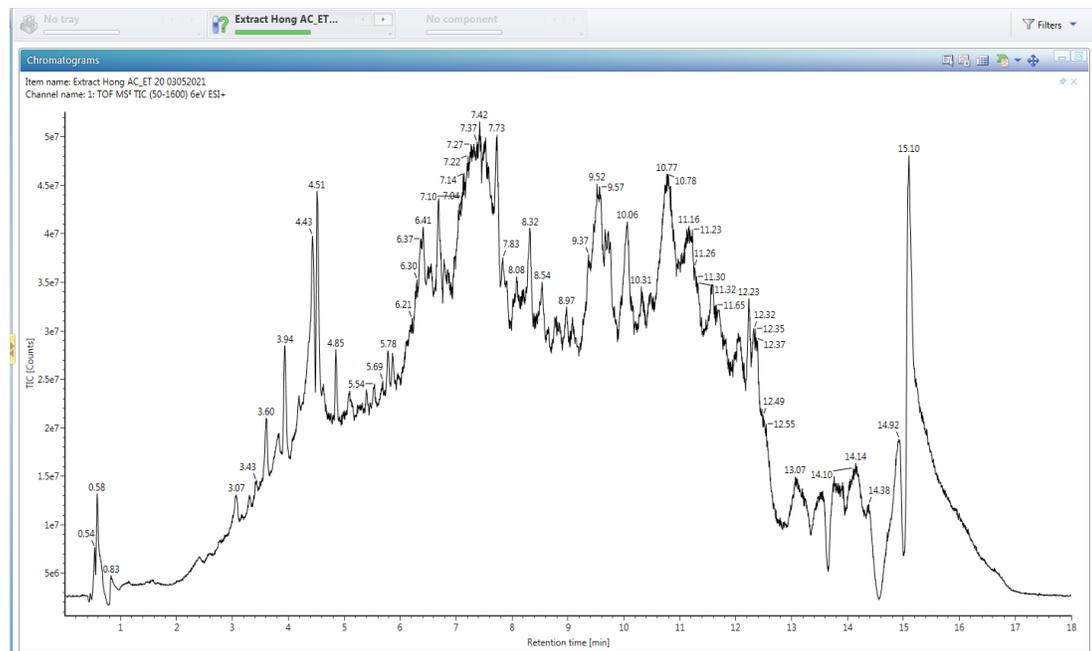
Anexo 8. Cromatograma del extracto 20 días particionado con hexano. Visualización de un cromatograma a partir de la inyección de un extracto obtenido en el LC-MS.



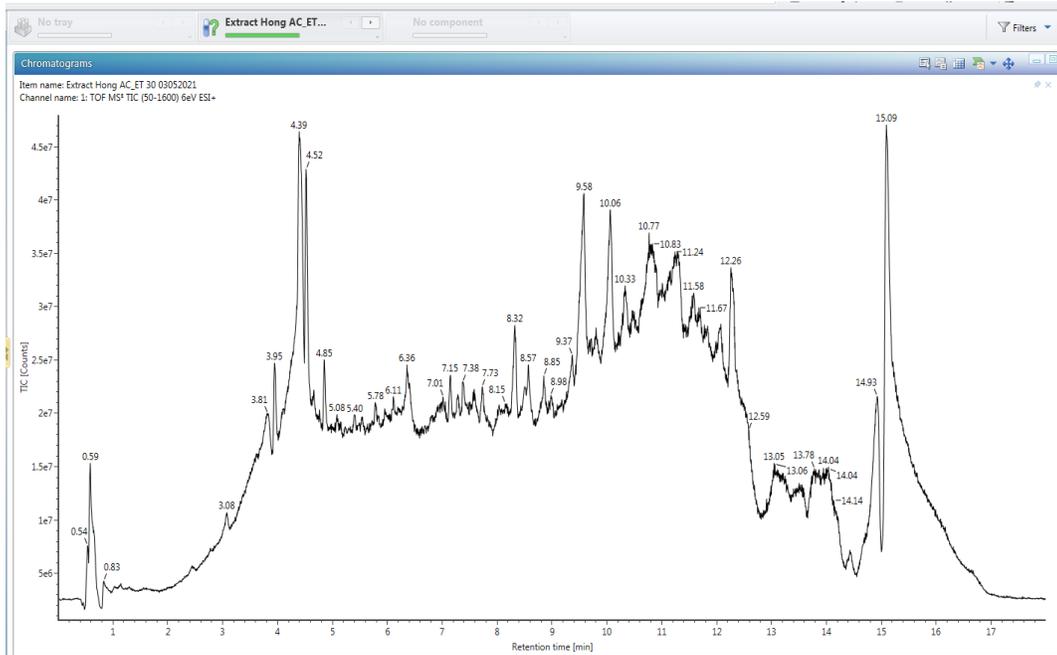
Anexo 9. Cromatograma del extracto 30 días particionado con hexano. Visualización de un cromatograma a partir de la inyección de un extracto obtenido en el LC-MS.



Anexo 10. Cromatograma del extracto 20 días particionado con acetato de etilo. Visualización de un cromatograma a partir de la inyección de un extracto obtenido en el LC-MS.



Anexo 11. Cromatograma del extracto 30 días particionado con acetato de etilo. Visualización de un cromatograma a partir de la inyección de un extracto obtenido en el LC-MS.



Anexo 12. Moléculas identificadas en el extracto particionado hexano 10 días. Identificación de moléculas mediante biblioteca del equipo LC-MS utilizando como parámetros aquellas moléculas que tengan ppm < 3 y factor de respuesta > 5000

Component name	Identification status	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Expected RT (min)	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
1 Sorbitol	Identified	182.0794	182.0793	205.0685	0.2	1.2	0.58	209954	265	-Na	
2 Sorbitol	Identified	182.0794	182.0793	205.0686	0.3	1.5	0.68	91549	964	-Na	
3 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1681	227.1753	-0.1	-0.3	4.95	16097	264	+H	
4 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1682	227.1755	0.1	0.4	3.37	22000	264	+H	
5 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1684	227.1756	0.2	1.0	0.62	160781	864	+H, +Na	
6 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1684	227.1756	0.2	1.1	4.53	18825	164	+H	
7 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1684	227.1757	0.3	1.1	2.94	97808	864	+H	
8 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1685	227.1758	0.4	1.8	3.81	97291	964	+H	
9 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1677	249.1569	-0.5	-1.9	10.59	50533	564	-Na	
10 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1677	249.1569	-0.4	-1.8	10.45	54296	564	-Na	
11 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1679	249.1571	-0.3	-1.0	9.22	51828	464	-Na	
12 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1679	249.1571	-0.2	-0.9	12.35	52739	564	-Na	
13 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1681	249.1573	-0.1	-0.2	15.38	138415	165	-Na	
14 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1681	249.1574	0.0	0.0	2.37	148339	165	-Na	
15 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1683	249.1575	0.2	0.7	1.09	134647	165	+Na, +H	
16 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1683	249.1576	0.2	0.9	1.60	77717	864	-Na	
17 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1685	249.1577	0.4	1.6	2.79	851198	6e5	+Na, +H	
18 Octahydrocurcumin	Identified	376.18839	376.1879	399.1771	-0.7	-1.7	6.77	5915	3e3	+Na	
19 Ganoderic acid H	Identified	572.29853	572.2997	573.3069	1.1	2.0	9.36	27857	8e3	+H	
20 Procyandín A2	Identified	576.12678	576.1257	577.1330	-1.1	-1.9	9.40	6735	5e3	+H	
21 Procyandín A2	Identified	576.12678	576.1257	577.1330	-1.1	-1.8	9.89	15055	8e3	+H, +Na	
22 Procyandín A2	Identified	576.12678	576.1258	577.1331	-1.0	-1.7	9.10	6218	6e3	+H	
23 Procyandín A2	Identified	576.12678	576.1259	577.1332	-0.9	-1.5	9.69	20405	1e4	+H, +Na	
24 Procyandín A2	Identified	576.12678	576.1262	577.1335	-0.6	-1.0	10.45	14770	1e4	+H	
25 Procyandín A2	Identified	576.12678	576.1264	577.1337	-0.4	-0.7	10.61	10735	9e3	+H, +Na	
26 Procyandín A2	Identified	576.12678	576.1265	577.1338	-0.3	-0.4	7.75	7886	5e3	+H	
27 Zeaxanthin	Identified	568.42803	568.4278	591.4170	-0.2	-0.4	13.72	422160	5e3	-Na	
28 Shengmanol-3-O...	Identified	620.39243	620.3927	621.4000	0.3	0.5	12.23	305267	2e4	+H	
29 Vinagrisenoside R1	Identified	842.50277	842.5042	843.5114	1.4	1.6	10.87	7482397	3e3	+H	
30 Kakkapomin II	Identified	926.52390	926.5238	927.5311	-0.1	-0.1	13.36	78322	4e3	+H	

Anexo 13. Moléculas identificadas en el extracto particionado hexano 30 días. Identificación de moléculas mediante biblioteca del equipo LC-MS utilizando como parámetros aquellas moléculas que tengan ppm < 3 y factor de respuesta > 5000.

Component name	Identification status	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Expected RT (min)	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
1 Sorbitol	Identified	182.0794	182.0794	205.0686	0.3	1.6		0.68	49515	5e4	+Na
2 Sorbitol	Identified	182.0794	182.0794	205.0686	0.4	1.9		0.57	82990	8e4	+Na
3 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1678	227.1751	-0.3	-1.4		8.70	11487	1e4	+H
4 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1679	227.1751	-0.3	-1.2		0.88	17675	2e4	+H
5 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1683	227.1756	0.2	0.9		0.61	20835	8e4	+H, +Na
6 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1685	227.1758	0.4	1.6		3.37	22340	2e4	+H
7 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1685	227.1758	0.4	1.7		4.53	21079	1e4	+H
8 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1678	249.1570	-0.3	-1.2		6.98	51055	5e4	+Na
9 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1681	249.1573	0.0	-0.2		2.23	84818	8e4	+Na
10 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1681	249.1573	0.0	-0.1		2.34	84818	8e4	+Na
11 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1681	249.1573	0.0	-0.1		12.33	59924	5e4	+Na
12 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1683	249.1576	0.2	0.8		1.59	51326	4e4	+Na
13 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1685	249.1577	0.4	1.6		2.80	705917	4e5	+Na, +H
14 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1685	249.1578	0.4	1.7		2.94	503355	4e5	+Na
15 Cyclo-(Leu-3e)	Identified	226.16813	226.1686	249.1578	0.5	1.9		1.08	141839	1e5	+Na, +H
16 Nonadecanoic ac...	Identified	312.30283	312.3034	335.2926	0.6	1.7		11.56	3554	4e3	+Na
17 19β-Glucosyl-14...	Identified	332.19876	332.1984	355.1877	-0.3	-0.9		9.92	10282	3e3	+Na
18 Teracigenin C	Identified	382.23554	382.2359	383.2432	0.4	1.1		11.69	50391	3e3	+H
19 S-o-Desmethyno...	Identified	388.11582	388.1154	389.1227	-0.4	-1.1		7.48	9357	8e3	+H
20 Meidenin	Identified	454.27192	454.2712	455.2785	-0.7	-1.6		11.66	4165	4e3	+H
21 Meidenin	Identified	454.27192	454.2722	477.2654	0.3	0.5		15.09	934733	4e3	+Na
22 Ganoderic acid H	Identified	572.28853	572.2895	573.3067	0.9	1.6		9.37	29558	8e3	+H
23 Procyandin A2	Identified	576.12678	576.1258	577.1331	-1.0	-1.7		9.41	35153	2e4	+H, +Na
24 Procyandin A2	Identified	576.12678	576.1262	577.1334	-0.6	-1.1		9.91	25956	1e4	+H, +Na
25 Procyandin A2	Identified	576.12678	576.1263	577.1335	-0.5	-0.9		10.20	23130	1e4	+H, +Na
26 Procyandin A2	Identified	576.12678	576.1263	577.1336	-0.5	-0.8		9.68	36436	2e4	+H, +Na
27 Procyandin A2	Identified	576.12678	576.1264	577.1337	-0.4	-0.6		9.54	21445	7e3	+H
28 Procyandin A2	Identified	576.12678	576.1272	577.1344	0.4	0.7		10.74	10964	6e3	+H, +Na
29 Ajugasterone C-2...	Identified	560.37130	560.3706	583.3598	-0.7	-1.2		12.36	220849	9e3	+Na
30 Zexanthin	Identified	568.42803	568.4275	591.4167	-0.6	-0.9		10.58	296777	1e4	+Na
31 Procyandin A2	Identified	576.12678	576.1267	599.1159	-0.1	-0.2		10.98	4362	4e3	+Na
32 Shengmanoi-3-O...	Identified	620.39243	620.3913	621.3985	-1.2	-1.9		13.01	423119	3e4	+H
33 Sericoside	Identified	666.39791	666.3979	667.4052	0.0	0.0		11.69	459893	9e3	+H
34 Cimicide C	Identified	842.46639	842.4654	843.4727	-1.0	-1.2		10.87	7132541	4e3	+H
35 Cimicide C	Identified	842.46639	842.4676	843.4749	1.2	1.4		12.24	769668	2e4	+H, +Na
36 Vinagrisenoside R1	Identified	842.50277	842.5015	865.4907	-1.3	-1.5		9.81	4524426	5e3	+Na
37 Kakasopomin II	Identified	926.52390	926.5252	927.5324	1.3	1.4		12.75	337089	4e3	+H

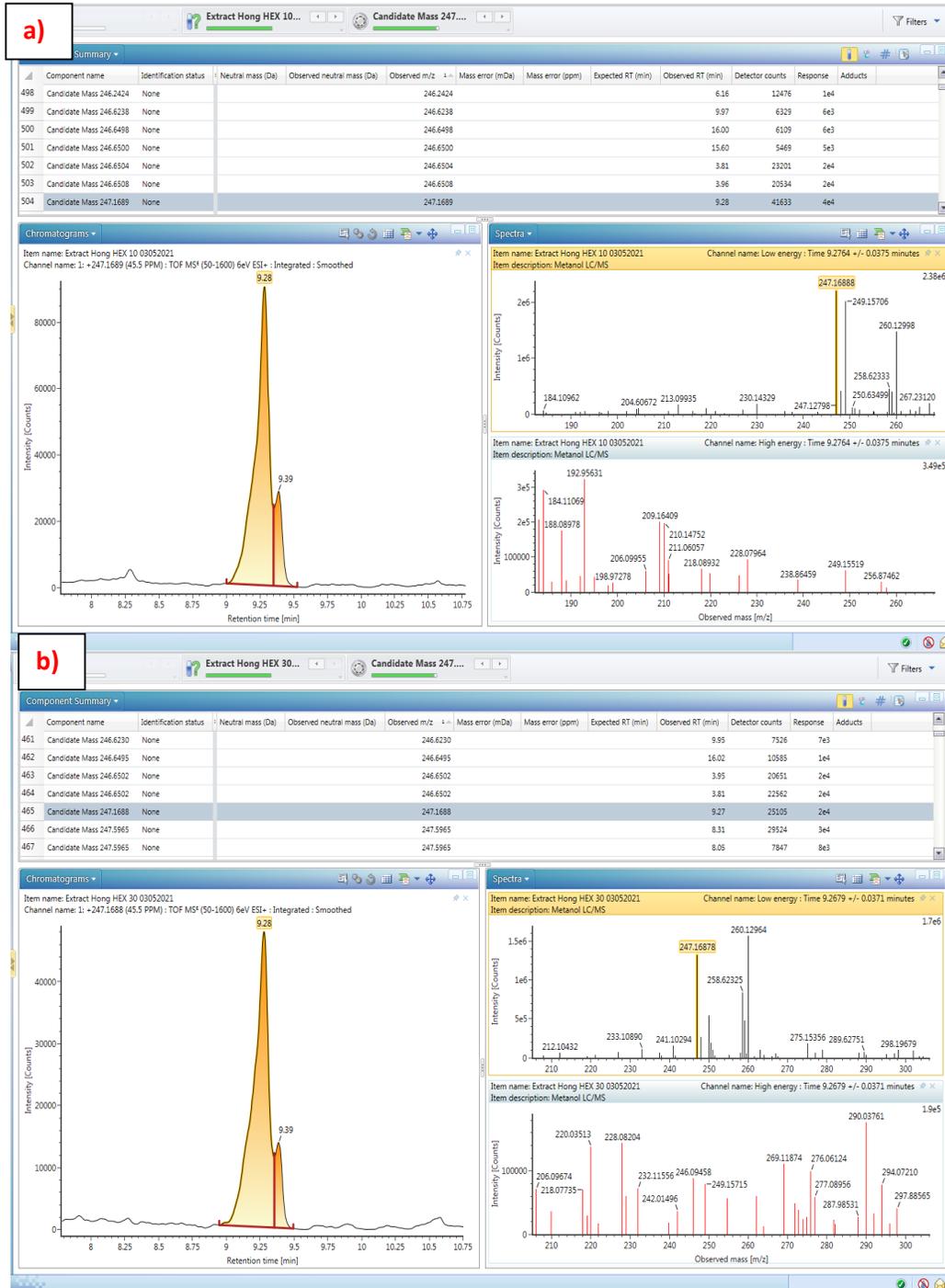
Anexo 14. Moléculas identificadas en el extracto particionado Acetato de etilo 10 días. Identificación de moléculas mediante biblioteca del equipo LC-MS utilizando como parámetros aquellas moléculas que tengan ppm < 3 y factor de respuesta > 5000.

Component name	Identification status	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Expected RT (min)	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
8 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1682	249.1574	0.1	0.3	15.33	120806	1e5	+Na	
9 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1682	249.1575	0.1	0.5	0.37	46594	4e4	+Na	
10 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1683	249.1575	0.2	0.8	1.07	178665	2e5	+Na	
11 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1684	249.1576	0.2	1.0	3.16	106159	1e5	+Na	
12 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1686	249.1578	0.5	1.9	2.79	300744	2e5	+Na, +H	
13 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1686	249.1578	0.5	1.9	2.94	229640	2e5	+Na, +H	
14 [10E,9S,12S,13S]-Trihydroxy-10-octadec...	Identified	344.25627	344.2560	367.2453	-0.2	-0.7	7.46	5469	5e3	+Na	
15 [10E,9S,12S,13S]-Trihydroxy-10-octadec...	Identified	344.25627	344.2562	367.2454	-0.1	-0.2	7.33	9813	8e3	+Na	
16 Tenacigenin C	Identified	382.23554	382.2351	405.2244	-0.4	-1.0	6.60	136178	5e3	+Na	
17 Quassin	Identified	388.18859	388.1893	411.1785	0.7	1.6	6.57	8498	4e3	+Na	
18 Phytolaccagenic acid	Identified	516.34509	516.3442	517.3515	-0.9	-1.7	12.56	312693	7e4	+H	
19 Evmonoside	Identified	520.30362	520.3032	521.3104	-0.5	-0.9	6.88	21365	5e3	+H	
19 Evmonoside	Identified	520.30362	520.3032	521.3104	-0.5	-0.9	6.88	21365	5e3	+H	
20 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1258	577.1331	-0.9	-1.6	10.42	14905	1e4	+H	
21 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1261	577.1334	-0.7	-1.2	9.94	23580	2e4	+H	
22 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1263	577.1336	-0.5	-0.8	9.40	70041	4e4	+H, +Na	
23 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1264	577.1337	-0.4	-0.6	9.55	107142	6e4	+H, +Na	
24 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1261	599.1153	-0.7	-1.2	9.69	10038	7e3	+Na	
25 Tiliroside	Identified	594.13734	594.1366	617.1258	-0.8	-1.2	7.74	12298	6e3	+Na	
24 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1261	599.1153	-0.7	-1.2	9.69	10038	7e3	+Na	
25 Tiliroside	Identified	594.13734	594.1366	617.1258	-0.8	-1.2	7.74	12298	6e3	+Na	
26 Shengmanoi-3-O- α -L-arabinopyranoside	Identified	620.39243	620.3914	621.3987	-1.0	-1.6	11.79	114359	3e4	+H	
27 Ginsenoside Rh4	Identified	620.42882	620.4287	643.4179	-0.1	-0.2	11.09	792619	8e3	+Na	
28 Sarcoside	Identified	666.39791	666.3967	689.3859	-1.2	-1.7	10.53	371719	6e3	+Na	
29 Vinaginsenoside R1	Identified	842.50277	842.5035	843.5107	0.7	0.8	10.45	616897	6e3	+H	
30 Kaiasapomin III	Identified	926.52390	926.5254	927.5327	1.5	1.6	13.05	638759	4e3	+H	

Anexo 15. Moléculas identificadas en el extracto particionado Acetato de etilo 20 días. Identificación de moléculas mediante biblioteca del equipo LC-MS utilizando como parámetros aquellas moléculas que tengan ppm < 3 y factor de respuesta > 5000.

Component name	Identification status	Neutral mass (Da)	Observed neutral mass (Da)	Observed m/z	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Expected RT (min)	Observed RT (min)	Detector counts	Response	Adducts
1 Pogostone	Identified	224.10486	224.1048	225.1121	-0.1	-0.3	3.91	8092	3e3	+H	
2 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1678	227.1751	-0.4	-1.5	4.96	14350	1e4	+H	
3 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1681	227.1754	0.0	-0.1	3.38	17576	2e4	+H	
4 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1682	227.1755	0.1	0.3	6.14	11069	1e4	+H	
5 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1686	227.1759	0.5	2.0	3.81	68058	6e4	+H	
6 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1679	249.1571	-0.3	-1.0	7.87	48403	4e4	+Na	
7 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1681	249.1573	0.0	-0.2	15.88	45060	5e4	+Na	
8 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1681	249.1574	0.0	0.1	2.05	51445	4e4	+Na, +H	
9 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1682	249.1575	0.1	0.5	3.30	35748	3e4	+Na	
10 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1683	249.1575	0.2	0.7	2.94	223228	1e5	+Na, +H	
11 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1683	249.1575	0.2	0.7	1.38	39550	4e4	+Na	
12 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1683	249.1576	0.2	0.8	2.79	301871	1e5	+Na, +H	
13 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1684	249.1576	0.2	0.9	1.09	84999	8e4	+Na	
14 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1684	249.1576	0.2	0.9	0.62	132564	9e4	+Na, +H	
15 Cyclo-(Leu-Ile)	Identified	226.16813	226.1684	249.1576	0.3	1.1	3.16	65719	6e4	+Na	
16 1,7-Dihydroxy-4-methoxy-1-(2-oxopropo...	Identified	312.09977	312.1002	335.0895	0.5	1.4	3.08	7819	5e3	+Na	
17 Nonadecanoic acid methyl ester	Identified	312.30283	312.3034	335.2926	0.5	1.6	11.55	5110	5e3	+Na	
18 6-Liofoline (Liofoline)	Identified	341.16271	341.1623	342.1695	-0.4	-1.3	3.81	124184	7e4	+H, +Na	
19 Mardenin	Identified	454.27192	454.2713	455.2786	-0.6	-1.4	8.61	5592	4e3	+H	
20 Mardenin	Identified	454.27192	454.2727	455.2800	0.8	1.8	11.64	97786	5e3	+H	
21 4'-Hydroxyimperatorin-4'-O- β -D-glucop...	Identified	448.13695	448.1371	471.1263	0.1	0.2	4.87	5155	4e3	+Na	
22 Phytolaccagenic acid	Identified	516.34509	516.3443	517.3515	-0.8	-1.6	12.55	42833	3e4	+H	
23 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1257	577.1330	-1.1	-1.8	10.17	22479	1e4	+H, +Na	
24 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1259	577.1332	-0.9	-1.5	9.92	26726	1e4	+H, +Na	
25 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1259	577.1332	-0.8	-1.5	11.40	6092	4e3	+H	
26 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1262	577.1334	-0.6	-1.1	8.72	7515	5e3	+H	
27 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1264	577.1337	-0.3	-0.6	9.55	74941	6e4	+H	
28 Procyanidin A2	Identified	576.12678	576.1265	577.1338	-0.3	-0.5	9.38	54462	3e4	+H, +Na	
29 (E)-Ferulic acid hexacosyl ester	Identified	558.46481	558.4642	581.4935	-0.6	-1.0	14.73	6164	4e3	+Na	
30 Ganoderic acid H	Identified	572.29853	572.2992	595.2885	0.7	1.2	15.11	997377	7e3	+Na	
31 Tiliroside	Identified	594.13734	594.1383	617.1256	-1.0	-1.6	7.74	10444	6e3	+Na, +H	
32 Shengmanoi-3-O- α -L-arabinopyranoside	Identified	620.39243	620.3912	621.3985	-1.2	-2.0	13.01	17789	1e4	+H	
33 Cimicif C	Identified	842.46639	842.4650	843.4723	-1.4	-1.6	11.99	405228	3e3	+H	
34 Kaiasapomin III	Identified	926.52390	926.5248	927.5321	0.9	1.0	11.53	213763	4e3	+H	

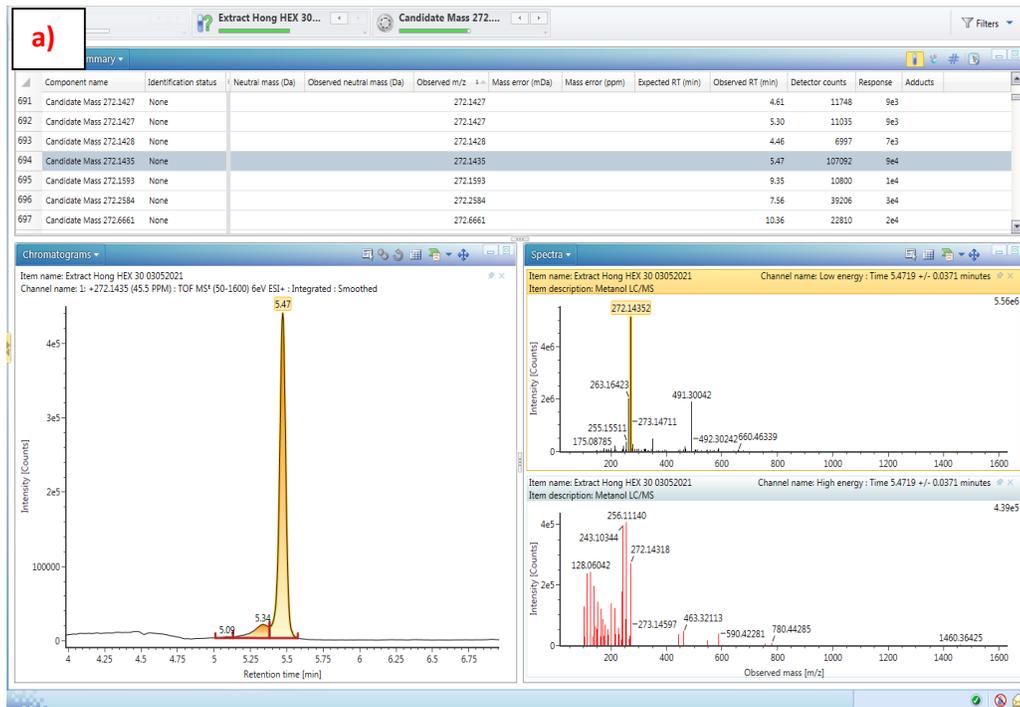
Anexo 17. Molécula identificada tentativamente en el extracto particionado: a) hexano 10 días b) hexano 30 días.



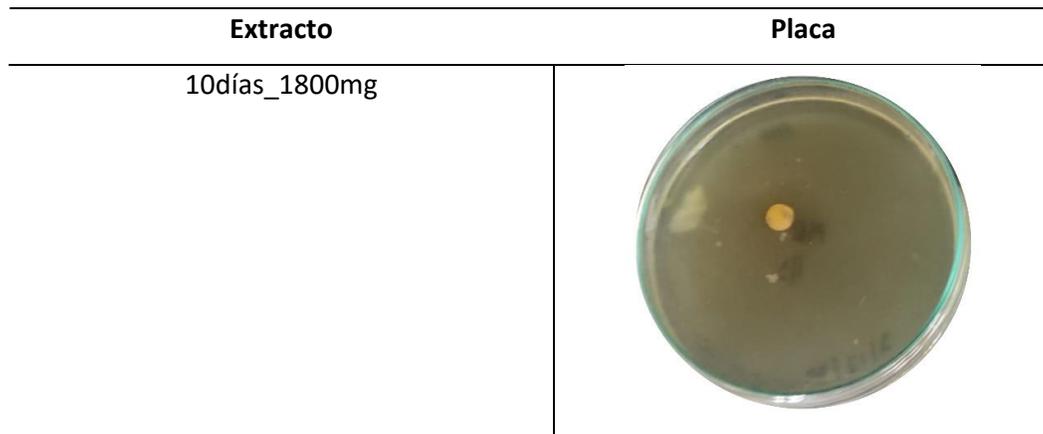
Anexo 18. Molécula identificada tentativamente en el extracto particionado: a) hexano 10 días b) hexano 30 días.

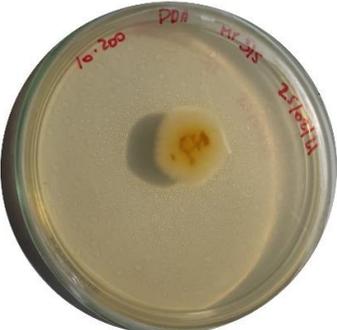


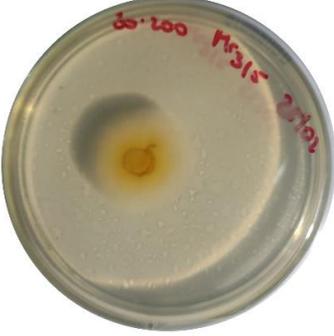
Anexo 19. Molécula identificada tentativamente en el extracto particionado hexano 30 días.

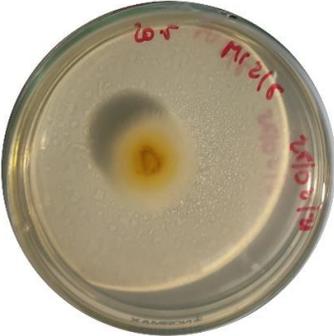


Anexo 20. Reporte fotográfico de la actividad antifúngica a los 7 días de incubación de *M. royeri*. Diferentes tasas de inhibición se presentaron cuando se suplementó con las distintas concentraciones de extractos y se observa que no hay variación entre el control negativo y solvente a los 7 días.



20días_1800mg	
30días_1800mg	
10días_200mg	
20días_200mg	

30días_200mg	
10días_20mg	
20días_20mg	
30días_20mg	

10días_5mg	
20días_5mg	
30días_5mg	
Control negativo	

Anexo 21. Gráfica de porcentajes de inhibición con respecto a las diferentes concentraciones de los extractos obtenidos a los 10, 20 y 30 días

