

Efecto de la reducción del hierro libre en el crecimiento y la producción de sideróforos en *Fusarium* spp. aislados de humanos, animales y plantas.



Luisa María Gutiérrez Lara
Paula Estefanía Rodríguez Romero

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología
Carrera de Microbiología Industrial
Bogotá D.C

2016

Efecto de la reducción del hierro libre en el crecimiento y la producción de sideróforos en *Fusarium* spp. aislados de humanos, animales y plantas.



Luisa María Gutiérrez Lara
Paula Estefanía Rodríguez Romero

Concepción Judith Puerta
Decana Facultad de Ciencias

Marcela Franco Correa
Directora Microbiología Industrial

Efecto de la reducción del hierro libre en el crecimiento y la producción de sideróforos en *Fusarium* spp. aislados de humanos, animales y plantas.



Luisa María Gutiérrez Lara
Paula Estefanía Rodríguez Romero

María Ximena Rodríguez
Directora del trabajo de grado

Melva Linares
Par evaluador

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Junio de 1946

"La universidad no se hace responsable de los conceptos emitidos por sus alumnos en sus proyectos de grado. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque los trabajos no contengan ataques o polémicas puramente personales. Antes bien, que se vea en ellos el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Reglamento de la Pontificia Universidad Javeriana

RESUMEN

Fusarium se caracteriza por ser patógeno en diferentes hospederos, como humanos, animales y plantas, donde se han identificado diversos factores de patogenicidad como la producción de diferentes enzimas y toxinas, capacidad de adherencia y síntesis de sideróforos. En los últimos años se ha reportado la importancia de los sideróforos en la homeostasis de hierro y en la virulencia en hospederos vegetales y animales. Debido a la importancia de los sideróforos y a que han sido poco reportados en especies de *Fusarium*, en el presente estudio se evaluó la producción de sideróforos como factor de patogenicidad de doce aislamientos de *Fusarium* spp. de diferentes hospederos (animal, humano y planta), mediante la técnica semicuantitativa de CAS-CAA placa y cuantitativa de sideróforos totales (Chromo azurol S®), sideróforos tipo hidroxamato y tipo catecolato. Adicionalmente, se evaluó el comportamiento de los aislamientos frente a condiciones limitantes de hierro, en agar extracto malta suplementado con 20mg/L de hidroxiquinolona.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el aislamiento 108, de la especie *F. solani* proveniente de micosis superficial animal, tuvo la mayor producción en el ensayo en placa y en la cuantificación de sideróforos totales. Seguido del aislamiento 161 (*F. verticillioides* obtenido de micosis superficial animal), tanto cuantitativa como cualitativamente. En los ensayos en placa se destacó también el aislamiento 310, correspondiente a *F. oxysporum* de origen vegetal; mientras que en el ensayo cuantitativo de sideróforos totales se destacó el 201 perteneciente a la especie *F. sporotrichioides*, aislado a partir de onicomiosis humana. Por otra parte, los aislamientos que tuvieron menor producción en ambos ensayos fueron el 406 y 409 de la especie *F. oxysporum* provenientes de fungemias humanas. Estos resultados indican relación clara entre la síntesis de sideróforos y la naturaleza del hospedero o la especie del aislamiento.

Adicionalmente, la cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato en relación a la cuantificación de sideróforos totales no presentó los valores esperados, teniendo en cuenta que este tipo de sideróforos son los que principalmente han sido reportados en especies fúngicas. Los aislamientos con mayor producción de sideróforos tipo hidroxamato fueron el 203 (*F. verticillioides*) y 310 (*F. oxysporum*) de origen superficial humano y de origen vegetal, respectivamente; por el contrario los aislamientos 404 (*F. solani*), 409 (*F. oxysporum*) y 108 (*F. solani*) sintetizaron la menor cantidad de estos metabolitos. En cuanto a los sideróforos tipo catecolato no se obtuvo cuantificación para ninguno de los doce aislamientos.

Por último, para la evaluación del crecimiento en condiciones limitantes de hierro se eligió la concentración 20 mg/L de 8-hidroxiquinolona por inducir estrés pero no letalidad en los aislamientos. Los aislamientos con menores porcentajes de inhibición del crecimiento radial fueron 310 (*F. oxysporum*) y 161 (*F. verticillioides*), mientras que el aislamiento 404 (*F. solani*) obtuvo un porcentaje de inhibición del crecimiento radial superior al 80%. Se obtuvo una relación inversamente proporcional entre la producción de sideróforos y el crecimiento en medio hipoférrico.

La producción de sideróforos para los doce aislamientos en el ensayo en placa y para la mayoría de estos en medio líquido, evidenció que no hay relación con el origen del aislamiento o con la especie, al igual que el desarrollo en condiciones limitantes de hierro.

1. INTRODUCCIÓN

Fusarium es un género de hongos oportunistas que pueden causar infecciones en humanos, especialmente si estos son inmunocomprometidos, ya que la susceptibilidad particular del hospedero es un factor determinante en el establecimiento y desarrollo de la infección (Nelson et al., 1994). La fusariosis es la principal micosis que afecta a pacientes inmunocomprometidos y la segunda enfermedad más común causada por hongos filamentosos (Salah et al., 2015). *Fusarium* también puede causar infecciones superficiales en individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos, generando queratitis, onicomicosis y dermatomicosis (Salah et al., 2015). Por otra parte, *Fusarium* causa enfermedades en plantas como marchitamiento vascular, pudrición de la raíz, chancros, bakanae, fusariosis en espigas y sarna en granos de cereales, entre otras (Nelson et al., 1994; Agrios et al., 1995). Al igual que otros hongos filamentosos patógenos, *Fusarium* puede ser considerado como un patógeno multihospedero capaz de infectar tanto a plantas como a animales y humanos (Di Prieto y González Roncero, 2004), utilizando mecanismos de virulencia compartidos entre hongos patógenos (Ortoneda et al., 2004).

Las especies de *Fusarium* poseen varios mecanismos celulares y moleculares que le confieren su capacidad patogénica, entre estos mecanismos se encuentran la síntesis de toxinas y enzimas líticas y su capacidad de adherencia a diferentes tejidos (Lin et al., 2005; Prados et al., 2006). Además de estos mecanismos, *Fusarium* spp. produce sideróforos, determinantes en la patogenicidad de animales y plantas (Oide et al., 2006). Estas moléculas de bajo peso molecular son utilizadas para atrapar el hierro libre, necesario en procesos celulares incluyendo la respiración, el ciclo de los ácidos tricarbónicos, detoxificación del estrés oxidativo, así como también para la síntesis de aminoácidos, desoxirribonucleótidos, lípidos y esteroides (Hass et al., 2008). La interacción sideróforo-hospedero, para el desarrollo de la enfermedad, ocurre por la acción de transportadores seguida por la reducción de Fe^{3+} para facilitar el intercambio del hierro al medio extracelular (Johnson, 2008). La capacidad patogénica de los sideróforos se evidenció en un estudio en 2006 realizado por Oide y colaboradores donde demostraron la disminución de la virulencia en plantas de cereales luego de la delección del gen *NSP6*, que codifica para una enzima necesaria para la síntesis de sideróforos.

La presente investigación busca evaluar la producción de sideróforos y el comportamiento frente a condiciones limitantes de hierro en aislamientos de *Fusarium* spp. para caracterizar la capacidad patogénica de los mismos. Asimismo, este proyecto permitirá profundizar en el estudio de los factores de patogenicidad de diferentes especies de *Fusarium* aisladas de lesiones de humanos, animales y plantas, en el marco del proyecto: ¿*Fusarium* spp. un modelo de patogenicidad multihospedero?.

2. REFERENTES CONCEPTUALES – MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Fusarium*

Fusarium es un género de hongos filamentosos que se encuentra habitualmente distribuido en el suelo, donde varias especies han sido consideradas durante mucho tiempo como importantes patógenos de plantas causando diferentes enfermedades en cereales de importancia económica a nivel mundial (Geng et al., 2014), como trigo, cebada, arroz, avena y maíz (Matić et al., 2013). También afecta significativamente otros cultivos como algodón, tabaco, café, caña de azúcar, árboles de sombra, frutales, hortalizas y ornamentales (Di Pietro et al., 2003). Dentro de las especies más prevalentes se encuentra *F. oxysporum*, agente causal de marchitamiento vascular en una amplia variedad de cultivos económicamente importantes (Madrid et al., 2002).

Algunas especies de *Fusarium* han sido reportadas como patógenas en humanos, produciendo un amplio espectro de infecciones oportunistas e infecciones invasivas como la fusariosis, en pacientes gravemente inmunocomprometidos (Madrid et al., 2002; Salah et al., 2015). Otras infecciones superficiales, como la queratitis o endoftalmitis causadas, frecuentemente por *F. solani* y *F. oxysporum* (Godoy et al., 2004; Chang et al., 2006) y la onicomiosis, se manifiestan con frecuencia en personas inmunocompetentes y usualmente se asocian con un trauma previo (Salah et al., 2015). Ocasionalmente, algunas especies de *Fusarium* pueden causar infecciones en los animales, causando meningitis y encefalitis tanto en animales grandes como pequeños (Evans et al., 2004).

2.2 Mecanismos de patogenicidad de *Fusarium*

La patogenicidad es definida como la capacidad de un microorganismo de causar daño en un hospedero, por lo que los mecanismos de patogenicidad definen el grado de virulencia de la enfermedad (Casadevall, 2007). Los hongos filamentosos patógenos de humanos y animales poseen diferentes mecanismos de patogenicidad entre los que se encuentran la capacidad de crecer a 37°C, soportar el pH fisiológico, sintetizar enzimas líticas, producir pigmentos, sintetizar sideróforos, además de la capacidad de adherencia, incluso a catéteres o lentes de contacto, favoreciendo la colonización de un tejido (Nelson et al., 1994; Shinton, 2014). Los hongos filamentosos patógenos de las plantas, también denominados fitopatógenos, han desarrollado estrategias para reconocer sus hospederos, penetrar e invadir el tejido de la planta, superar las defensas del hospedero y optimizar su crecimiento en la planta (Hass et al. 2008). Para esto el hongo debe percibir señales químicas y físicas del hospedero y responder con el metabolismo adecuado y cambios morfogénicos necesarios para el desarrollo patogénico, incluyendo el crecimiento hifal dirigido, la adherencia a la superficie de la planta, la diferenciación de estructuras especializadas de infección y la secreción de enzimas líticas y toxinas (Di Pietro et al., 2001).

Fusarium spp. produce un amplio rango de metabolitos secundarios biológicamente activos, como las micotoxinas que son perjudiciales para humanos y animales. Las fumonisinas son una clase de micotoxinas producidas por este microorganismo. Entre las especies de *Fusarium* aisladas de arroz, se destacan *F. verticillioides* y *F. proliferatum* como mayores productores de estas toxinas (Matić et al., 2013). Además de las fumonisinas, *Fusarium* produce otras toxinas como zearalenonas, moniliformina y tricotecenos (Nesic et al., 2014). Este género es también capaz de producir enzimas como las colagenasas, proteasas y queratinasas, que son necesarias para colonizar tejidos en hospederos humanos y animales (Nelson et al., 1994; Pekkarinen et al. 2000). Junto con estas enzimas, *Fusarium* spp. produce una serie de enzimas que le permiten degradar la

pared y otros componentes celulares de plantas, dentro de las cuales se encuentran celulasas, xilanasas, pectinasas, lipasas y amilasas (Wanjiru et al., 2002; Yamamura & Shim, 2008). Sin embargo, se ha demostrado que *Fusarium* spp. puede ingresar al hospedero a través de aberturas naturales en las raíces generadas por el proceso de ramificación o heridas generadas por nematodos o insectos mordedores (Sella et al., 2013).

Otro mecanismo de patogenicidad que posee *Fusarium* spp. es la producción de sideróforos, moléculas de bajo peso molecular sintetizadas por los microorganismos para quelar hierro (Renshaw et al., 2002). Estas moléculas son de vital importancia ya que permiten mantener el equilibrio adecuado de hierro entre la deficiencia y toxicidad, y un control ajustado de los sistemas de captación y almacenamiento del mismo (Hass et al, 2008).

2.3 Importancia del hierro para los microorganismos

El hierro es un elemento esencial para los microorganismos ya que es un cofactor de varias enzimas y actúa en los procesos de transporte y reacciones redox, por lo que se ha estimado que una concentración de al menos 1 μM de hierro es necesaria para su crecimiento; sin embargo, esta concentración varía para los diferentes organismos (Neilands 1995). Para garantizar la concentración necesaria de este elemento se requiere de mecanismos altamente sincronizados para mantener el balance entre la toma, el almacenamiento y el consumo de este metal, procesos conocidos como homeostasis del hierro (Yong-Sung et al., 2007; López-Berges et al. 2012).

En una condición limitada de hierro, los hongos producen sideróforos para secuestrar iones férricos, que se unen a receptores de membrana externa específicos con alta afinidad, donde algunos grupos de donantes para la quelación de Fe^{3+} son hidroxamatos, thiohidroxamatos y catecolatos (Silva-Stenico et al., 2005). Además, algunos hongos fitopatógenos producen compuestos únicos que funcionan tanto como toxinas y como queladores de hierro (Renshaw et al., 2002).

Existen varios mecanismos de adquisición de hierro, separados en los sistemas de alta y baja afinidad; donde el funcionamiento del sistema de alta afinidad se ha visto asociado a condiciones limitantes de hierro, mientras que los sistemas de baja afinidad son importantes durante periodos de abundancia relativa de hierro. Por lo anterior, los hongos patógenos con frecuencia se encuentran en situaciones en la que los sistemas de alta afinidad son necesarias para permitir la supervivencia dentro del hospedero. Los sistemas de alta afinidad se clasifican en dos tipos principales, asimilación reductora de hierro y la captación de hierro de sideróforos mediada (o asimilación de hierro no reductorista) (Johnson 2008).

2.4 Sideróforos

La mayoría de los microorganismos como bacterias y hongos expresan mecanismos específicos para la adquisición de hierro de los hospederos que infectan para su propia supervivencia. Esto se debe principalmente a que el hierro juega un papel catalizador clave en varias reacciones celulares vitales; además este no está disponible en numerosos ambientes por lo que es necesario captarlo o secuestrarlo del medio (Johnson, 2008). Este sistema de captación está mediado principalmente por la producción de una molécula de bajo peso molecular ($M_r < 1,500$ Da) denominada sideróforo (Johnson 2008; Howard 1999). Dependiendo del grupo químico principal que participa en la quelación del hierro, los sideróforos se clasifican en catecolatos, carboxilatos e hidroxamatos, intra o extracelulares; aunque algunos de ellos no pertenecen exclusivamente a alguna de estas clases (Hass et al. 2008; Mossialos et al., 2009). Sin embargo, los hongos producen principalmente

sideróforos de tipo hidroxamato (Renshaw et al., 2002). Oide y colaboradores en el 2007 demostraron que al menos en los hongos Ascomycetos sólo se requieren sideróforos extracelulares para la patogenicidad en plantas.

Otros estudios han evidenciado que algunos sideróforos fúngicos actúan como determinantes de patogenicidad, dado que los componentes de la ruta reductora asimilativa del hierro son necesarios para la virulencia (Hass et al. 2008). Sin embargo, se han encontrado reportes donde las especies no patógenas de *Fusarium* producen más sideróforos que las especies patogénicas, dando una ventaja e incluso potencial inhibitorio a las no patógenas frente a las que son capaces de producir enfermedad (Renshaw et al., 2002).

Adicionalmente, los sideróforos tienen un papel en el mantenimiento de interacciones simbióticas entre hongos y plantas (Johnson 2008); en primer lugar, la formación de sideróforos puede solubilizar el hierro que antes no se encontraba de forma disponible para la planta, y en segundo lugar, la mayor producción de sideróforos por microorganismos no patógenos frente a los patógenos, puede reducir el crecimiento de microorganismos con capacidad de infectar la planta, al suprimir el hierro disponible en el medio (Renshaw et al., 2002).

Aunque se sabe poco acerca de la producción de sideróforos como un mecanismo de patogenicidad de especies del género *Fusarium*, un estudio realizado por Oide y colaboradores (2006) reportaron por primera vez el papel de sideróforos extracelulares en la virulencia a las plantas. Los resultados mostraron que los mutantes deficientes en la capacidad para biosintetizar sideróforos extracelulares son hipersensibles a estrés oxidativo y bajo contenido de hierro (Hass et al., 2008); además de comprobar que reducen la patogenicidad en plantas de arroz y avena, por parte de los fitopatógenos *Cochliobolus miyabeanus*, *Fusarium graminearum* y *Alternaria brassicicola* (Oide et al., 2007). El genoma de *F. graminearum* fue analizado por Tobiasen et al. (2007), quienes identificaron los genes *NPS*, *NPS1*, *NPS2* y *NPS6*, relacionados con la biosíntesis de sideróforos hidroxamato, ferricrocina y fusarina, respectivamente. Recientemente se ha reportado que en ausencia del gen *NPS2*, responsable de la síntesis de sideróforos intracelulares, se inhibe la producción de esporas sexuales (Oide et al., 2014). En el caso de delección del gen *NPS6*, requerido para la biosíntesis de sideróforos extracelulares, no se afecta la reproducción sexual pero si la sensibilidad a la captación de hierro, al estrés oxidativo y se genera una disminución en la virulencia (Oide et al. 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de producción de sideróforos por parte de *Fusarium* spp. de diferente origen y su crecimiento en presencia y ausencia de un agente quelante de hierro.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar semicuantitativa y cuantitativamente la producción de sideróforos de doce aislamientos de *Fusarium* spp. de diferente origen de hospedero.
- Determinar la influencia de un agente quelante de hierro en el crecimiento de doce aislamientos de *Fusarium* spp.

4. METODOLOGÍA

4.1 Aislamientos de *Fusarium* spp.

Se trabajó con un total de 12 aislamientos de *Fusarium* spp. distribuidos de acuerdo a su origen (Tabla 1). Los aislamientos se encuentran en la colección de microorganismos de la Unidad de Investigaciones Agropecuarias de la Pontificia Universidad Javeriana – Bogotá. Se estableció un banco de trabajo por la técnica de conservación en papel filtro almacenado a temperatura de refrigeración.

Tabla 1. Aislamientos de *Fusarium* spp. en estudio.

Origen de aislamiento	Código	Especie	Características de la lesión de aislamiento
Animal (superficial)	108	<i>F. solani</i>	Micosis superficial - Ojo de bovino
	161	<i>F. verticillioides</i>	Micosis superficial - Cola de canino
	162	<i>F. oxysporum</i>	Micosis superficial - Lomo superior de canino
Humano (superficial)	201	<i>F. sporotrichioides</i>	Onicomycosis
	203	<i>F. verticillioides</i>	Queratitis
	205	<i>F. oxysporum</i>	Onicomycosis
Vegetal	310	<i>F. oxysporum</i>	Marchitamiento vascular - Haces vasculares de planta de tomate
	314	<i>F. oxysporum</i>	Marchitamiento vascular - Haces vasculares de planta de clavel
	319	<i>F. oxysporum</i>	Marchitamiento vascular - Haces vasculares de planta de gulupa
Humano (sistémico)	404	<i>F. solani</i>	Fungemia - Hemocultivo de paciente neutropénico
	406	<i>F. oxysporum</i>	Fungemia - Hemocultivo de paciente neutropénico
	409	<i>F. oxysporum</i>	Fungemia - Hemocultivo de paciente neutropénico

Como control positivo para la evaluación de sideróforos se utilizó un aislamiento de *Fusarium graminearum*, especie reportada en literatura como productora de sideróforos.

4.2 Evaluación semicuantitativa de la producción de sideróforos

La evaluación semicuantitativa de la producción de sideróforos se realizó en el medio CAS-CAA (Caballero et al., 2007) (Anexo 4), la cual se evidenció por la formación de un halo color rosa-púrpura o amarillo alrededor de la colonia. Para esto, se inoculó 50 μ L de suspensión conidial (10^6 conidios/mL) con agar agua (10g/L, proporción 1:1) en un pozo en el centro de la placa de agar, las placas se incubaron durante 7 días a 28°C, midiendo el diámetro del halo desarrollado en placa el quinto día de incubación. La prueba se llevó a cabo con cuatro réplicas.

Adicionalmente, se realizó un ensayo modificando la base del medio utilizando las sales del caldo Simmon y Tessman (1963) (Anexo 4), para comparar si la composición del medio puede o no influenciar en la presentación del halo de producción de sideróforos. Las condiciones de siembra y periodos de incubación fueron los mismos que los del medio CAS-CAA (Caballero et al., 2007).

4.3. Cuantificación de sideróforos totales, tipo hidroxamato y tipo catecolato

Los aislamientos de *Fusarium* spp. se cultivaron en caldo Simon & Tessman (1963) (Anexo 4) para inducir la producción de sideróforos. Los cultivos se realizaron en frascos compota con un volumen de 20mL de caldo Simon y Tessman + 200 μ L de suspensión conidial (10^6 conidios/mL). Estos frascos se incubaron durante 6 días en agitación (120rpm) a 28°C. El último día incubación se tomó una alícuota de 10mL del cultivo y centrifugó a 4000 rpm por 15 min (Thermo Scientific, CL10). Posteriormente, el sobrenadante fue separado en tubos eppendorf para centrifugar nuevamente a 10000 rpm por 10 min para separar la biomasa fúngica restante (microcentrífuga SCIOLOGEX, D2012). El sobrenadante obtenido se utilizó para la cuantificación de sideróforos por las pruebas colorimétricas. Las pruebas contaron con cuatro réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por cada réplica biológica.

4.3.1 Cuantificación de sideróforos totales.

La curva de calibración para sideróforos totales con el reactivo CAS se realizó con diluciones entre 25 y 600 μ g/mL a partir de un stock de 1mg/mL de deferroxamina mesilato (Anexo 1). El reactivo CAS se preparó a partir de 60mL de solución de HDTMA (10mM), 15mL de solución de hierro (1mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10mM HCl), 75mL de solución de CAS acuoso (2mM), los cuales se aforaron en un balón de 1L (Schwyn y Neilands, 1987). La reacción tuvo una relación 1:1 (0,5mL de muestra + 0,5mL de reactivo CAS), el tiempo de incubación a temperatura ambiente fue de 4 horas (Radzki et al. 2013) y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 630nm (Caballero et al., 2007). El blanco de lectura se realizó con 0,15mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM (10mM HCl) y 0,6 mL de HDTMA 10mM aforados a un volumen de 10 mL. Este blanco también fue leído en una relación 1:1 (0,5mL medio control + 0,5mL de blanco). Finalmente, a partir de los valores de absorbancia obtenidos, se graficó la curva patrón para la posterior cuantificación de sideróforos totales de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp.

La reacción de cuantificación de sideróforos totales para los aislamientos de *Fusarium* spp. tuvo un volumen final de 1 mL (0,5mL de muestra + 0,5mL de reactivo CAS) (Schwyn y Neilands, 1987). Posterior al tiempo de reacción (30 minutos), se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 630nm. El blanco de lectura se realizó con una relación 1:1 (0,5mL de medio Simon y Tessman sin inocular + 0,5mL de reactivo CAS).

4.3.2 Cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato.

La curva de calibración para sideróforos tipo hidroxamato se llevó a cabo con el reactivo de Atkin (1970) a partir de diluciones de un stock de 1mg/mL de deferroxamina mesilato entre 25 y 800µg/mL (Anexo 1). La reacción tuvo una relación 1:1 (0,5mL de muestra + 0,5mL de reactivo de Atkin) y se realizó la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro a 480nm (Shin et al., 2001). El blanco de lectura se realizó con una relación 1:1 (0,5mL de agua + 0,5mL de reactivo de Atkin). A partir de los valores de absorbancia obtenidos, se graficó la curva patrón para la posterior cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp.

La reacción tuvo un volumen final de 1 mL (0,5mL de muestra + 0,5mL de reactivo de Atkin) (Atkin et al., 1970). Inmediatamente después de mezclar la muestra y el reactivo, se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 480nm. El blanco de lectura se realizó con una relación 1:1 (0,5mL de medio Simon y Tessman sin inocular + 0,5mL de reactivo de Atkin).

4.3.3 Cuantificación de sideróforos tipo catecolato.

La curva de calibración para sideróforos tipo catecolato se realizó a partir de una serie de diluciones del stock de Catecol entre 0 y 70µg/mL (Anexo 1). La detección se realizó por el test de Arnow (Arnow et al., 1937) con una relación 1:4 (0,5mL de muestra + 0,5mL de HCl (0,5N) + 0,5mL del reactivo nitrito de molibdato, 0,5mL de NaOH (1N) y 0,5 mL de agua destilada). El blanco de lectura se realizó con una relación 1:4 (1mL de agua destilada + 0,5 de HCl (0,5N) + 0,5mL del reactivo nitrito de molibdato + 0,5mL de NaOH (1N)). Posteriormente se realizó la lectura de absorbancias en el espectrofotómetro a 515nm (Howard 1999). Finalmente, a partir de los valores de absorbancia obtenidos, se graficó la curva patrón para la posterior cuantificación de sideróforos tipo catecolato de las 12 aislamientos de *Fusarium* spp.

La reacción de cuantificación se realizó a un volumen final de 2,5mL correspondiente a 0,5mL de la muestra + 0,5mL de HCl 0,5N + 0,5mL de reactivo molibdato de sodio + 0,5mL de NaOH 0,1N y 0,5mL de agua destilada. Después de reaccionar, se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 515nm. El blanco de lectura se realizó reemplazando el volumen de muestra por el medio Simon y Tessman sin inocular.

4.4. Crecimiento de *Fusarium* spp. en condiciones limitantes de hierro

La determinación de la concentración de hidroxiquinolina (agente quelante de hierro) en agar extracto de malta (Anexo 4), se llevó a cabo evaluando concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40 y 50 mg/L. Los ensayos se realizaron con el control positivo *F. graminearum* utilizando disco de agar micelio y 5 réplicas por cada concentración. Las placas se llevaron a incubación por un período de siete días a temperatura de 28°C, evaluando el diámetro del crecimiento del hongo cada 24 horas. El control de crecimiento se realizó en agar extracto de malta sin suplemento de hidroxiquinolina.

Luego de determinar 20 mg/mL como la concentración de hidroxiquinolina que inhibía el crecimiento del microorganismo pero no era letal para este, se evaluaron los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. sembrando una suspensión conidial (10⁶ conidios/mL) con agar agua (10g/L, proporción 1:1) en un pozo en el centro de la placa de agar. Cada aislamiento contó con cinco réplicas además de las cinco de control sin suplemento de hidroxiquinolina. Las placas se llevaron a incubación por un período de 7 días a temperatura de 28°C, evaluando el diámetro del crecimiento de la colonia cada 24 horas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Aislamientos de *Fusarium* spp.

A partir del banco de conservación en papel filtro, se recuperaron los doce aislamientos del estudio y el control positivo, *F. graminearum*, en PDA y agar avena. La viabilidad y pureza del banco de trabajo fue buena, ya que la morfología tanto macroscópica como microscópica corresponde a la descrita previamente para los mismos aislamientos (Linares, 2010). La pureza de los aislamientos se comprobó realizando lámina en fresco con azul de lactofenol, observando la formación típica de microconidios hialinos, unicelulares, de forma ovoide a cilíndrica. En algunos aislamientos, se encontraron macroconidios hialinos, multicelulares, rectos, con células curvadas o en punta.

5.2 Evaluación semicuantitativa de la producción de sideróforos de los aislamientos de *Fusarium* spp.

La evaluación semicuantitativa de producción de sideróforos en medio CAS-CAA placa de los doce aislamientos de *Fusarium* spp. se realizó en base a los ensayos con el control positivo *F. graminearum*. El quinto día de crecimiento fue seleccionado como el de mayor producción de sideróforos con respecto a la medición del halo producido y el análisis del área bajo la curva (Anexo 2). El halo presentó una coloración rosada hacia el centro y azul-violeta hacia la periferia (Figura 1).

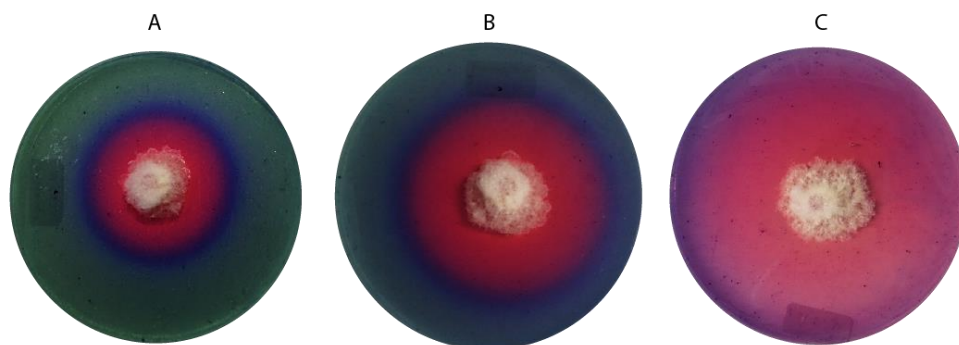


Figura 1. Producción de sideróforos por parte de *Fusarium graminearum* en medio CAS-CAA placa en los días 3 (A), 4(B) y 5(C) de crecimiento a 28°C.

Los resultados obtenidos en el ensayo semicuantitativo de producción de sideróforos en medio CAS-CAA evidenciaron que la totalidad de los aislamientos de *Fusarium* sp. produjeron un halo rosado hacia el centro y azul-violeta hacia la periferia, sin mostrar diferencias notorias entre ellos (Figura 2). Sin embargo, el aislamiento que presentó mayor producción fue el aislamiento 108. Este aislamiento identificado como *F. solani*, fue obtenido a partir de una muestra superficial de origen animal. Aunque no han sido reportado numerosos estudios sobre la producción de sideróforos por parte de esta especie, Dutta y colaboradores en 2006 evaluaron la producción de sideróforos en

nueve aislamientos fúngicos, encontrando a *F. solani* como productor de sideróforos en el ensayo de CAS-CAA placa, únicamente en concentraciones bajas de hierro.

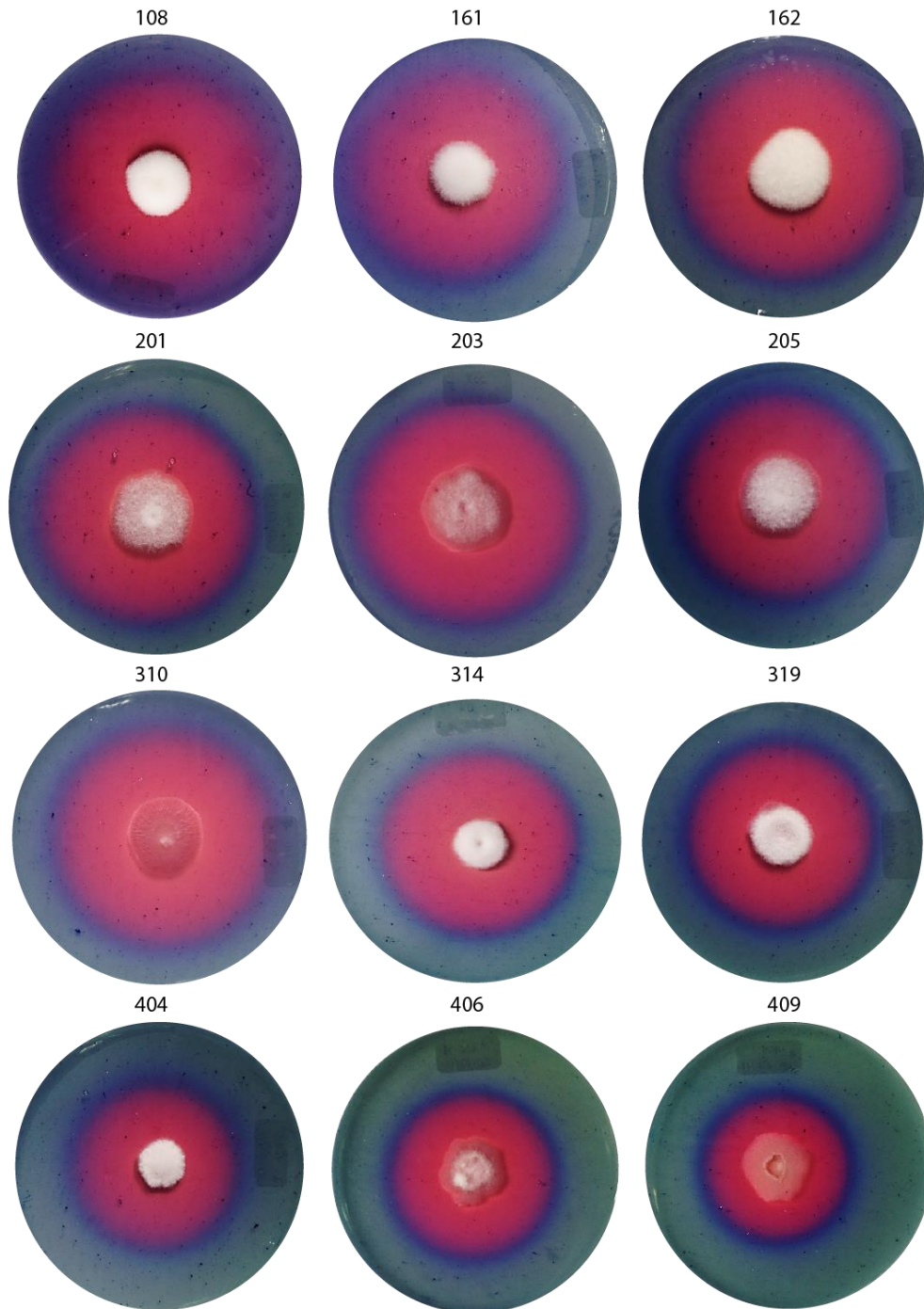


Figura 2. Producción de sideróforos de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. en medio CAS-CAA placa en el cuarto día de crecimiento a 28°C.

Entre otros aislamientos que presentaron valores altos de producción de sideróforos en CAS placa, se encuentran los aislamientos 161 y 310, identificados como *F. verticillioides* y *F. oxysporum*, respectivamente. Estudios previos han reportado la expresión de genes relacionados con el hierro en especies de *Fusarium*. En el caso de *F. verticillioides* se ha reportado la producción de sideróforos extracelulares evaluada mediante la expresión de *FRI1*, gen responsable del transporte hierro-sideróforos; encontrando producción y expresión únicamente en medios no suplementados con hierro (López-Errazqín et al. 2006). Mientras que en *F. oxysporum* se han hecho comparaciones buscando genes *NRPS* reportados en otras especies fúngicas; de los once encontrados, se evidenció un gen que codifica para la ornitina N(5)-monooxigenasa SidA, encargada de catalizar el paso inicial en las vías de biosíntesis de sideróforos intra y extracelulares (López-Berges et al. 2013). Por lo anterior, se comprueba que estos dos aislamientos tienen la capacidad de regular la producción de metabolitos asociados a la captación de hierro.

Por otro lado, los aislamientos que obtuvieron una menor producción de sideróforos en placa fueron 409 y 406, identificados como *F. oxysporum*. Estos dos difieren de los mencionados anteriormente por el origen de aislamiento; siendo estos últimos pertenecientes al grupo de fungemias humanas. Las diferencias en el comportamiento de los aislamientos de origen humano sistémico pueden deberse a que en mamíferos el hierro está fuertemente unido a proteínas de transporte como la transferrina, la ferritina y la lactoferrina; por lo que se dificulta la captación microbiana de hierro (Hass, 2008). Estas condiciones hipoférricas favorecerían la expresión de metabolitos involucrados en la captación de hierro como los sideróforos, sin embargo en hongos patógenos de humanos y animales, como *Cryptococcus neoformans*, se han reportado otros mecanismos para dicha captación, entre estos se encuentran las melaninas, las reductasas y el ácido 3-hidroxiantranílico encargados de la reducción de ion férrico al ion ferroso (Kronstad et al. 2013). Estos mecanismos de adquisición de hierro son conservados entre los patógenos fúngicos, por lo que los aislamientos 409 y 406 pueden estar usando alguno de estos, para la captación de hierro.

En cuanto a los resultados obtenidos en el ensayo de CAS placa con la base de sales Simon y Tesson, se observaron dos patrones de halo, indicando la producción de sideróforos en los doce aislamientos de *Fusarium* spp. (Figura 3). El primero, con tonalidades rosadas-amarillas y el segundo, con única coloración amarilla pálida. Aunque no han sido reportados experimentos con este medio modificado, estudios previos han reportado tonalidades similares en el medio CAS-CAA, indicando cambios de la coloración azul inicial a tonos en la gama del púrpura, magenta y naranja (Milagres et al. 1999, Machuca y Milagres 2003, Caballero 2006). La coloración del halo que se produce en el medio ha sido asociado al tipo de sideróforo producido; en el caso de una tonalidad amarilla se ha relacionado con sideróforos tipo carboxilato y/o hidroxamato, mientras que las coloraciones rosadas indican principalmente la producción de sideróforos tipo catecolato (Pérez-Miranda et al. 2007). Sin embargo, el pH tiene un papel fundamental en la reacción colorimétrica de CAS, ya que el reactivo CAS líquido es sensible a cambios de pH, adquiriendo tonalidades púrpuras en pH alcalino (Heui et al. 2001). Adicionalmente, Payne (1994) menciona que la medida de absorbancia para sideróforos tipo hidroxamato se hace en función del pH, debido a que en pH neutro los monohidroxamatos presentan color rojo a naranja, mientras que en pH menor o igual a 5 su color vira a púrpura. El cambio de pH en el medio puede deberse al metabolismo de la glucosa, liberando ácidos orgánicos como cítrico, fumárico o glucónico mediante la vía de asimilación de las pentosas (Ruíz, 2013).

Además del color observado en este ensayo, los halos producidos en los doce aislamientos de *Fusarium* spp. son mínimos en comparación con los evidenciados en medio CAS-CAA; lo que se observa realmente es el cambio del color en el reverso de la colonia (Anexo 3). Debido al cambio del medio CAS-CAA con las sales del medio Simon y Tessman, la síntesis de los sideróforos puede verse influenciada, posiblemente en la difusión de las moléculas de sideróforos.

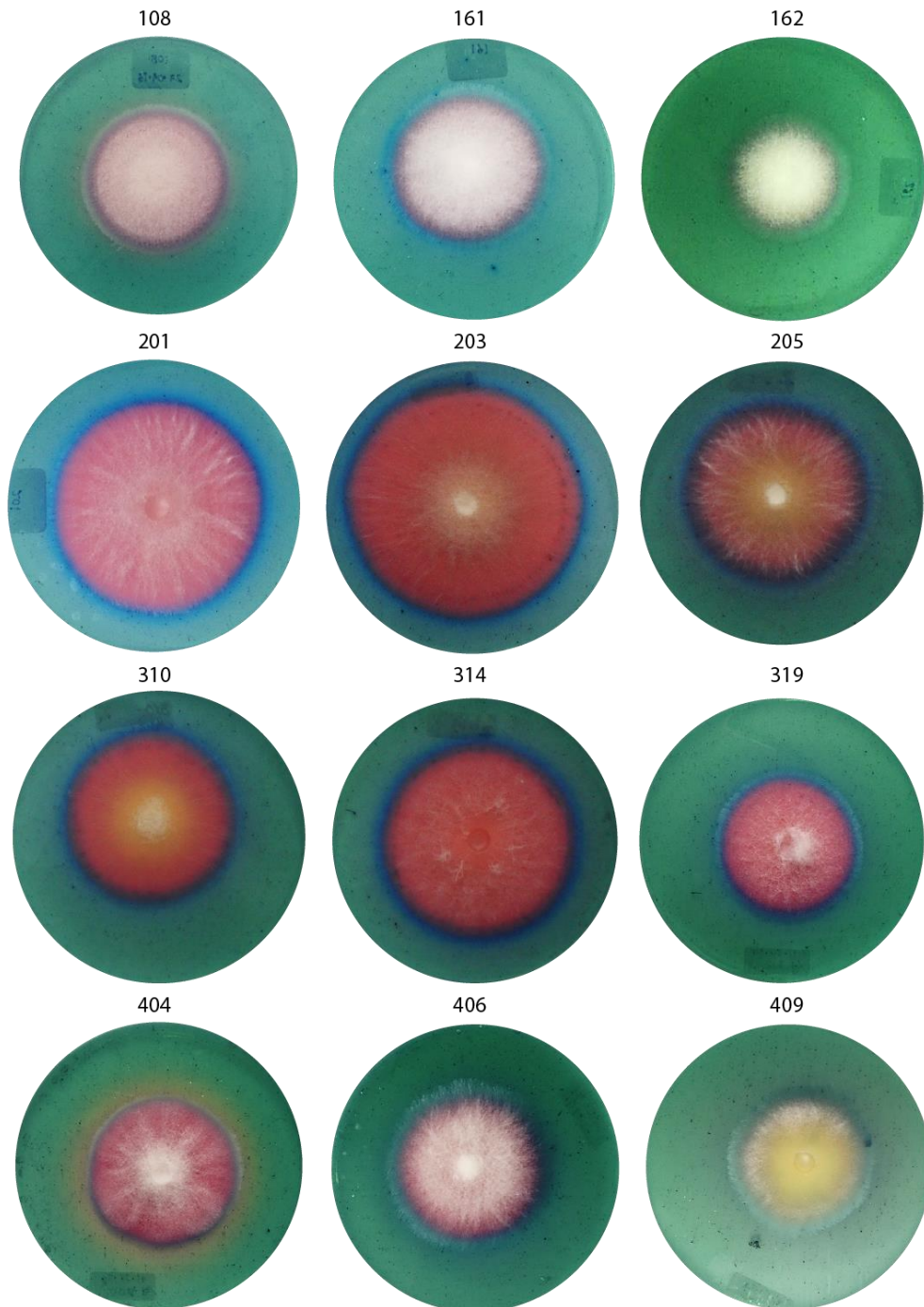


Figura 3. Producción de sideróforos de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. en medio CAS-CAA con la base de sales Simon y Tessman en el quinto día de crecimiento a 28°C.

Los resultados obtenidos por el análisis de varianza (ANOVA de un factor) de los datos de área bajo la curva de la medición del halo hasta el quinto día de incubación fueron agrupados creando grupos homogéneos de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan, donde se obtuvieron un total de cinco subconjuntos (Anexo 2). Estas agrupaciones exponen los aislamientos con mayor y menor producción de sideróforos evaluados semicuantitativamente (Figura 4), evidenciando que no hay una relación directa entre el origen de los aislamientos y la producción de sideróforos en placa, ya que los subconjuntos no estaban agrupados por aislamientos del mismo origen. Adicionalmente, no se observó relación entre aislamientos de una misma especie de *Fusarium*.

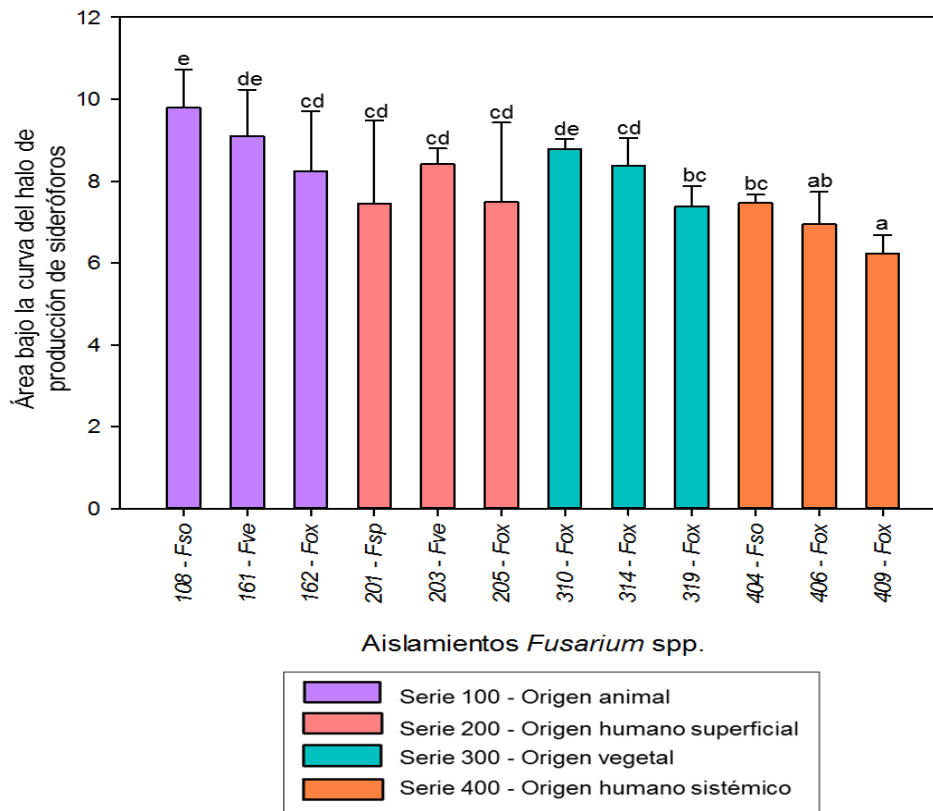


Figura 4. Evaluación semicuantitativa de la producción de sideróforos de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. en medio CAS-CAA mediante el análisis de área bajo la curva a 28°C.

5.3 Cuantificación de sideróforos totales, tipo hidroxamato y tipo catecolato

La selección del medio para la cuantificación de sideróforos totales, tipo hidroxamato y tipo catecolato se fundamentó en que el medio Simon y Tessman es libre de hierro, por lo que induce la producción de sideróforos de los aislamientos de actinobacterias (Franco-Correa et al. 2010). El sexto día de crecimiento fue el elegido para la cuantificación de los sideróforos, siendo el día

reportado como el de máxima producción en estudios previos del grupo de investigación (Osso y Royet, 2008).

5.3.1 Cuantificación de sideróforos totales

La evaluación cuantitativa de la producción de sideróforos totales en los doce aislamientos de *Fusarium* spp. evidenció su capacidad de producir sideróforos pues la reacción con el reactivo CAS mostró coloración púrpura a rosado. Los resultados obtenidos por el análisis de varianza (ANOVA de un factor) de la cuantificación de sideróforos totales en el sexto día de incubación fueron agrupados de acuerdo a la prueba de comparación múltiple de Duncan, donde se obtuvieron un total de ocho subconjuntos (Anexo 2). Estas agrupaciones evidencian que no hay una relación directa entre el origen de los aislamientos y la producción cuantitativa de sideróforos totales, puesto que los subconjuntos no se encuentran agrupados por series del mismo origen.

Reportes previos indican que diversas especies de *Fusarium* poseen el gen *NRPS6*, que ha sido asociado a la producción de sideróforos extracelulares, específicamente las Fusarininas (Hansen et al. 2012). Dentro de los aislamientos, se destaca el 108, identificado como *F. solani* como el mayor productor de sideróforos en medio líquido, seguido de los aislamientos 161 y 201 identificados como *F. verticillioides* y *F. sporotrichioides*, respectivamente. Por otro lado, dentro de los aislamientos con menor producción de sideróforos totales se encontraron 406 y 409, ambos aislados a partir de una muestra sistémica de origen humano, e identificados como *F. oxysporum*. El aislamiento 319 fue el único que no presentó producción de sideróforos totales (Figura 5). Con respecto a este último resultado, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de CAS-CAA placa, la ausencia de producción de sideróforos totales por este aislamiento puede deberse a que la cantidad producida no fue suficiente para ser detectada por el ensayo con el reactivo CAS líquido, como fue sugerido por Machuca y Milagres (2003), quienes evaluaron la producción de sideróforos por *Aspergillus* spp., obteniendo resultados positivos en el ensayo semicuantitativo y ausencia para algunas especies en el cuantitativo.

Según los resultados obtenidos, los aislamientos de origen humano sistémico (aislamientos 406 y 409) son aquellos que presentaron menor producción de sideróforos totales. Aunque este tipo de aislamientos cuentan con una condición de termotolerancia que les permite sobrevivir y colonizar hospederos homeotermos (Ying y Feng, 2004), en hospederos humanos la síntesis y la viabilidad de los sideróforos puede verse disminuida por la respuesta inmune inata que desarrolla el hospedero, al verse afectado por el patógeno (Goetz et al. 2002). Un ejemplo de esta respuesta inmunológica es reportada por Yang y colaboradores (2002) quienes demuestran que los hospederos mamíferos poseen una proteína denominada lipocalina, que es capaz de secuestrar los sideróforos microbianos. Aunque no se realizó una evaluación *in vivo*, estos aislamientos podrían captar hierro de su hospedero a partir de otros mecanismos diferentes a los sideróforos (Sección 5.2).

5.3.2 Cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato

La reacción de cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato con el reactivo de Atkin mostró una coloración en la gama del naranja pálido para los doce aislamientos de *Fusarium* spp. Respecto al análisis de varianza, se generaron seis subconjuntos por la prueba de comparación múltiple de Duncan (Anexo 2), los cuales no evidenciaron relaciones entre el origen de los aislamientos, es decir que la producción de sideróforos tipo hidroxamato no está asociada a la procedencia del hospedero.

Los aislamientos que presentaron las mayores concentraciones fueron aquellos identificados como *F. verticillioides* (203) y *F. oxysporum* (310), mientras que 409 (*F. oxysporum*), 404 y 108 (*F. solani*) fueron los que presentaron menor producción de sideróforos tipo hidroxamato (Figura 5). La principal producción de sideróforos tipo hidroxamato ha sido asociada a los hongos filamentosos y algunas bacterias Gram positivas (Szebesczyk et al. 2016). Cuatro sideróforos tipo hidroxamato han sido reportados, entre ellos fusarininas presentes en *F. verticillioides*, *F. oxysporum* y *F. solani* (Winkelmann 1992). En el caso de *F. verticillioides* se han reportado micoferritinas, sideróforo tipo hidroxamato en medios con bajas concentraciones de hierro (Validandi et al. 2009). Además, *F. verticillioides* tiene relaciones filogenéticas con *F. oxysporum* muy estrechas, compartiendo 12 genes *NRPS*, por lo que ambas especies se ven asociadas a las mayores concentraciones de producción de sideróforos tipo hidroxamato con respecto al resto de los aislamientos (Hansen et al. 2012).

5.3.3 Cuantificación de sideróforos tipo catecolato

La evaluación de la producción de sideróforos tipo catecolato no fue detectable para los doce aislamientos de *Fusarium* spp. (Figura 5). Aunque la producción de sideróforos ha sido reportada en diferentes géneros microbianos, los sideróforos tipo catecolato predominan en bacterias Gram negativas (Szebesczyk et al. 2016). Si bien en hongos filamentosos no se han reportado estructuras definidas como sideróforos tipo catecolato, en *Gloephyllum trabeum*, hongo de proredumbre de la madera, se han descrito compuestos quelantes de metal estructuralmente similares a los catecolato con la capacidad de unirse al ion férrico y reducir el ion ferroso (Machuca et al. 2007).

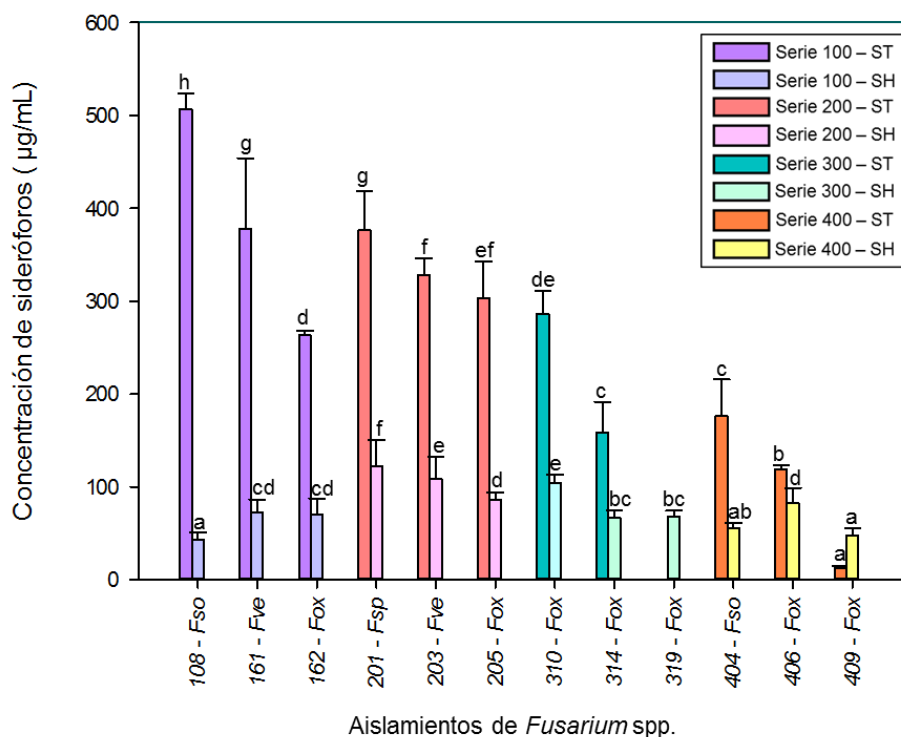


Figura 5. Evaluación cuantitativa de la producción de sideróforos de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. en medio líquido Simon y Tessman en el sexto día de crecimiento. Sideróforos totales (ST) y Sideróforos tipo hidroxamato (SH). La serie 100, 200, 300 y 400 corresponden a aislamientos de origen superficial animal, humano superficial, vegetal y humano sistémico, respectivamente.

5.4 Crecimiento de *Fusarium* spp. en condiciones limitantes de hierro

Para establecer la concentración adecuada del agente quelante de hierro que permitiera observar el estrés inducido por su acción y no un efecto letal para los microorganismos, se evaluó el crecimiento radial de *F. graminearum* durante 7 días en diferentes concentraciones de 8-hidroxiquinolina (figuras 6 y 7). Se determinó la concentración de 20mg/L para la evaluación con los doce aislamientos de *Fusarium* spp., por presentar inhibición evidente respecto al crecimiento radial en 5 y 10 mg/L, con un porcentaje de 36,05%, en el último día de crecimiento. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA de un factor) de los datos de área bajo la curva de la medición de crecimiento radial (Anexo 2), seleccionando la menor concentración que inhibió significativamente el crecimiento radial basado en las agrupaciones de Duncan.

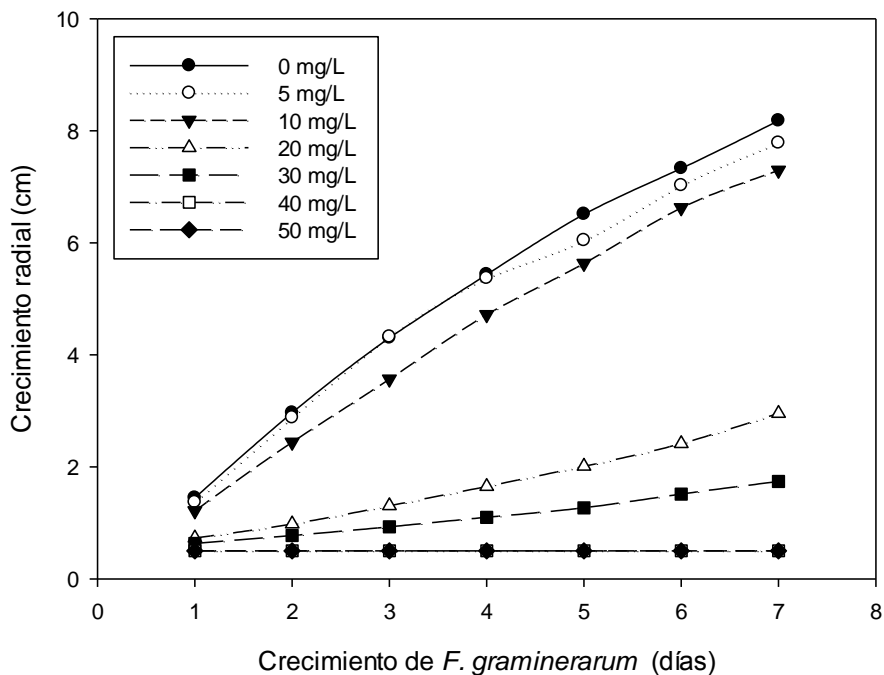


Figura 6. Cinética de crecimiento (diámetro de extensión de la colonia) de *Fusarium graminearum* a diferentes concentraciones hidroxiquinolina en medio extracto malta.

La evaluación del comportamiento de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp. de diferente origen frente a 8-hidroxiquinolina se determinó mediante el porcentaje de inhibición de crecimiento radial

(PICR) (Figura 8). A partir de este análisis se observó que el aislamiento 404 (*F. solani*) presentó el mayor porcentaje de inhibición (80,1%). Además, el total de los aislamientos evaluados superó el 50% de inhibición de crecimiento radial demostrando así la importancia del hierro para el desarrollo de los hongos, ya que se ha demostrado que el hierro unido a moléculas de hidroxiquinolona causa daños oxidativos, así como ruptura de cadenas de ADN en células fúngicas cultivadas (Pierre et al., 2003).



Figura 7. Crecimiento de *Fusarium graminearum* en agar extracto malta a diferentes concentraciones de 8-hidroxiquinolona durante siete días a 28°C.

Con respecto al análisis de varianza de los datos del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) (Anexo 2), se obtuvo un total de seis subconjuntos de acuerdo al agrupamiento de la prueba de comparación múltiple de Duncan; en los que no se evidenciaron relaciones entre el origen de los aislamientos (Figura 8 y figura 9). Es decir que la inhibición es independiente de la naturaleza del hospedero, ya que en el análisis estadístico los aislamientos más inhibidos fueron de diferente

origen. Adicionalmente, no se observó relación entre aislamientos de una misma especie de *Fusarium*.

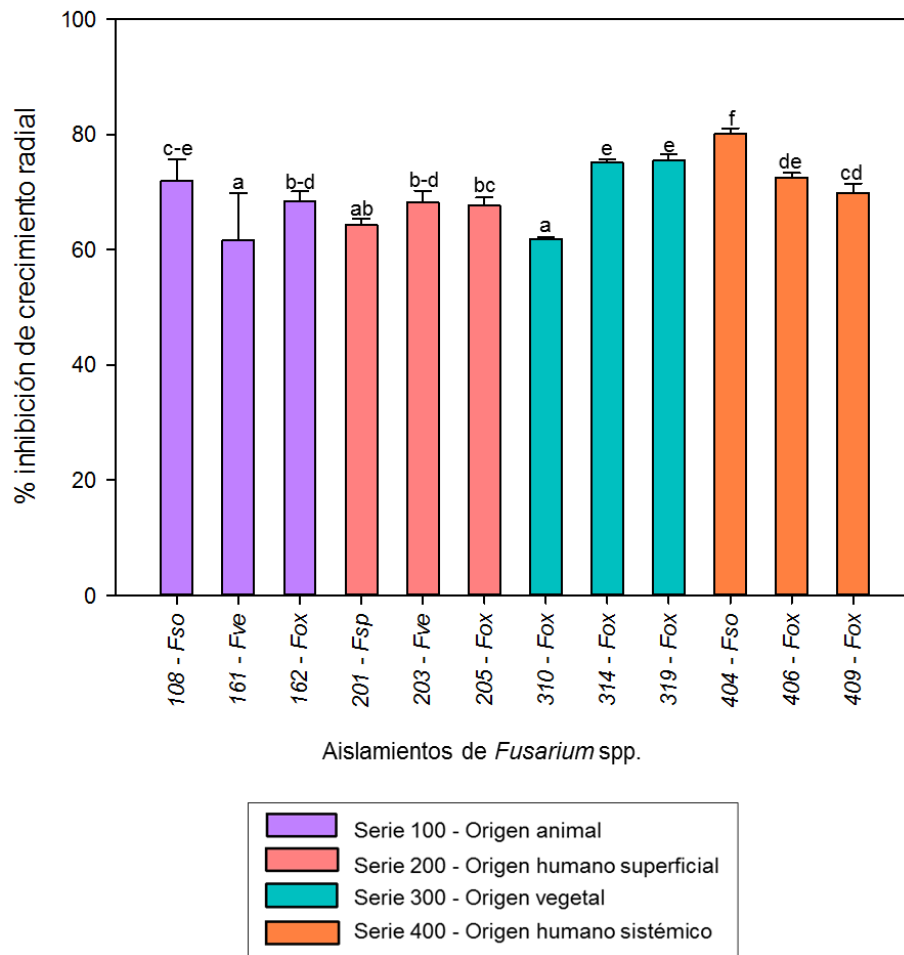


Figura 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento radial de los 12 aislamientos de *Fusarium* spp en medio extracto de malta frente a 20mg/L de 8-hidroxiquinolina el séptimo día de crecimiento.

La hidroxiquinolina es un agente quelante lipófilico (Hoyos-Carvajal et al. 2009) conocido por poseer una gran afinidad por hierro, especialmente la 8-hidroxiquinolina que ha demostrado ser eficaz captando hierro de forma *in vitro* (Mouralian et al., 2005), sin afectar la morfología de las colonias (Szaniszlo 2013). La captación de hierro la realiza mediante la formación de cinco anillos estables u oxinatos que atrapan varios metales, ya que son de baja selectividad (Pierre et al., 2003). Estos metales son requeridos para el funcionamiento de la ADN polimerasa y para la síntesis protéica, por lo que la 8-hidroxiquinolina puede inhibir simultáneamente dos o más actividades metabólicas dependiendo de su concentración intracelular (Mils 1978). A pesar de la capacidad inhibición en procesos celulares, la quelación por 8-hidroxiquinolina puede verse afectada por disminución del pH y la cantidad de iones divalentes que se encuentren en el medio (Fraser y Creanor 1974). El efecto en el crecimiento que tiene la 8-hidroxiquinolina sobre los doce aislamientos de *Fusarium* spp. con respecto a lo evidenciado en el medio control (extracto de malta, anexo 4) se observa de forma más clara en la figura 9.

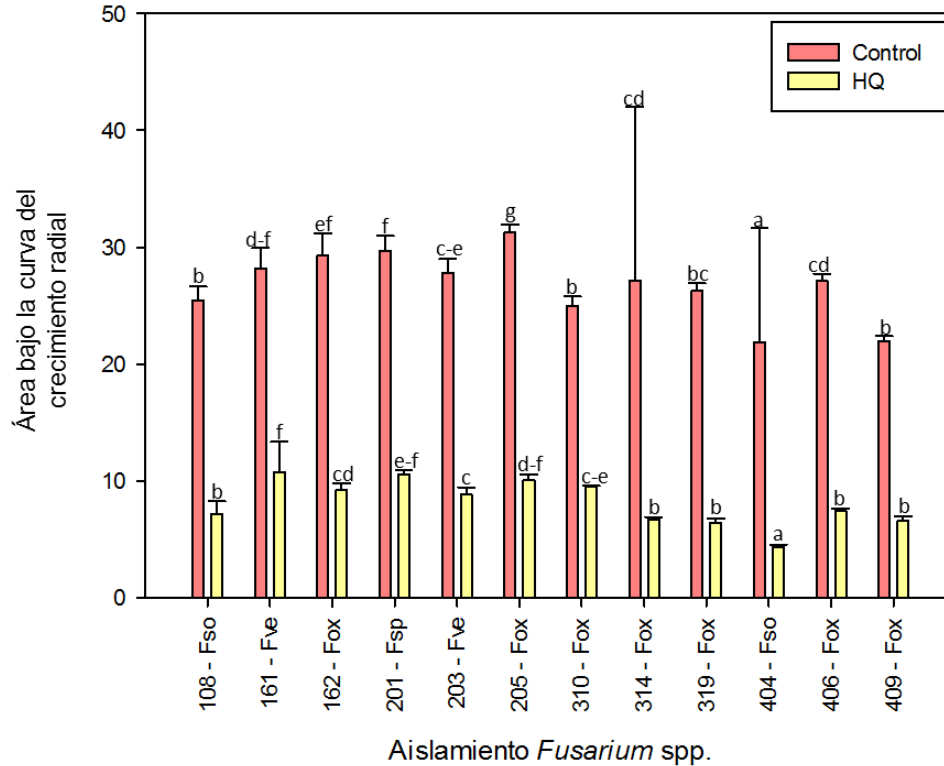


Figura 9. Efecto de la concentración de hidroxiquinolina (20mg/L) en el crecimiento de 12 aislamientos de *Fusarium* spp. en medio extracto malta mediante comparación del área bajo la curva del crecimiento radial durante 7 días de crecimiento a 28°C.

Una de las principales causas de los altos porcentajes de inhibición de crecimiento radial en los doce aislamientos de *Fusarium* spp. por parte del quelante, se debe a su capacidad de separar y retener más fuertemente el hierro de las moléculas fúngicas encargadas de la captación (Symeonidis 2009). Por esto, los quelantes bióticos o abióticos pueden ser utilizados para caracterizar y tratar enfermedades humanas causadas por sobre carga de hierro, también pueden utilizarse quelantes similares para aliviar toxicidad por exceso de hierro en plantas (Pierre et al. 2003).

Por otro lado, según los resultados obtenidos la capacidad de crecimiento de los hongos en medios hipoférricos y su relación con la producción de sideróforos es inversamente proporcional, ya que se observa una significativa reducción de crecimiento a mayores concentraciones de hidroxiquinolina (figura 7). Si bien se ha reportado que a una menor concentración de hierro la producción de sideróforos aumenta (Dutta et al. 2006), en medios sin ninguna traza de este elemento, los microorganismos no pueden desarrollarse. Esto quiere decir que el medio debe tener una concentración de al menos 1 μM de hierro, que es necesaria para el crecimiento microbiano (Neilands 1995), y en concentraciones superiores de 30mg/L (Figura 7) el agente quelante reduce casi al 100% esta disponibilidad, causando inhibición de los microorganismos.

5.5 Análisis de correlación entre producción de sideróforos y crecimiento en condiciones limitantes de hierro

A partir del análisis de correlaciones (coeficiente de Pearson) realizado entre los datos del ensayo cuantitativo de producción de sideróforos, área bajo la curva de CAS-CAA placa y porcentaje de inhibición de crecimiento radial por 8-hidroxiquinolina, se evaluó la interacción entre todos los resultados (Tabla 1).

La correlación obtenida entre la producción de sideróforos totales y de tipo hidroxamato fue positiva, indicando una leve relación proporcional. Sin embargo, esta relación no es estadísticamente significativa. Este resultado concuerda con lo reportado previamente en literatura donde la producción de sideróforos tipo hidroxamato ha sido asociada principalmente a los hongos (Szebesczyk et al. 2016).

En el análisis entre la cuantificación de sideróforos totales y la síntesis de sideróforos en el ensayo en placa se obtuvo una correlación significativa con un coeficiente de 0,699. Esta correlación positiva también fue determinada por Machuca y colaboradores (2007), quienes observaron una variación en la producción de sideróforos totales comparando los resultados obtenidos en placa con respecto a los obtenidos en medio líquido, asociándola a la capacidad de los sideróforos para difundirse en cultivos líquidos a diferencia de los cultivos agarizados. Por el contrario, la correlación entre la cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato y la producción de sideróforos totales en el ensayo en placa no fue significativa, indicando que podría haber mayor producción de sideróforos tipo carboxilato que también ha sido reportada en hongos (Pérez-Miranda, 2007).

Los coeficientes de correlación entre la producción de sideróforos totales y sideróforos tipo hidroxamato con respecto al porcentaje de inhibición de crecimiento radial por 8-hidroxiquinolina indican relaciones inversamente proporcionales. Esta asociación era esperada, ya que la síntesis de sideróforos depende de la disponibilidad de hierro en el medio, aumentando la producción en condiciones deficientes de este microelemento (Machuca y Milagres, 2003). De igual forma, la correlación entre la producción de sideróforos evaluada semicuantitativamente y la inhibición de crecimiento radial por 8-hidroxiquinolina fue negativa.

El análisis de correlación integró todos los resultados, determinando las relaciones esperadas aunque sin significancia estadística en la mayoría de los casos. La falta de significancia indica que hay diferencias entre los datos analizados evidenciando nuevamente que no hubo relación entre el origen de los aislamientos y los resultados de cada evaluación; esto se debe a que los sideróforos no son factores de patogenicidad exclusivos de un tipo de hospedero por tanto no necesariamente predomina su producción en aislamientos de un mismo origen (Hass, 2008).

Tabla 1. Matriz de correlación entre las diferentes pruebas para la evaluación cuantitativa de la producción de sideróforos (sideróforos totales y sideróforos hidroxamato), el área bajo la curva en CAS-CAA (CAS-CAA ABC) y porcentaje de inhibición de crecimiento radial por 8-hidroxiquinolina (PICR).

Correlaciones					
		Sideróforos totales	Sideróforos hidroxamato	CASabc	PICRHQ
Sideroforos totales	Correlación de Pearson	1	,126	,696	-,498
	p-valor		,213	,000	,000
Sideróforos hidroxamato	Correlación de Pearson	,126	1	,104	-,472
	p-valor	,213		,440	,000
CASabc	Correlación de Pearson	,696	,104	1	-,232
	p-valor	,000	,440		,083
PICRHQ	Correlación de Pearson	-,498	-,472	-,232	1
	p-valor	,000	,000	,083	

6. CONCLUSIONES

- Los aislamientos con mayor actividad en la evaluación de la producción de sideróforos en CAS-CAA placa fueron los aislamientos 108 de origen animal superficial identificado como *F. solani*, 161 de origen animal superficial identificado como *F. verticillioides* y 310 de origen vegetal, identificado como *F. oxysporum*, lo que permite relacionar la producción de sideróforos como posible mecanismo de patogenicidad en diferentes hospederos.
- No se observaron halos de producción de sideróforos comparables entre el medio CAS-CAA y el medio CAS + sales del caldo Simon y Tessman en los doce aislamientos de *Fusarium* spp., debido a la diferencia en coloración que puede asociarse al tipo de sideróforo o al pH del medio; y el tamaño del halo relacionado con la capacidad de difusión de los metabolitos en el medio.
- La mayoría de los aislamientos sintetizaron sideróforos totales y tipo hidroxamato, confirmando que no existe relación entre el origen del aislamiento o la especie con la cantidad o tipo de sideróforos producido.
- La evaluación de la producción de sideróforos tipo catecolato no fue detectable para los doce aislamientos de *Fusarium* spp., este resultado puede estar asociado a la sensibilidad de la técnica de cuantificación o a que este tipo de sideróforos ha sido poco reportado en hongos.
- La correlación entre la cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato y la producción de sideróforos totales en el ensayo en placa no fue significativa, indicando que podría haber mayor producción de sideróforos tipo carboxilato para los doce aislamientos de *Fusarium* spp.
- La evaluación del comportamiento de los doce aislamientos de *Fusarium* spp. en medio extracto de malta suplementado con 20mg/L de hidroxiquinolina, permitió establecer el porcentaje de inhibición micelial, donde el total de los aislamientos evaluados superó el 50% de inhibición de crecimiento radial.
- Se encontró una relación inversamente proporcional entre la producción de sideróforos y el crecimiento en medio hipoférrico, lo que podría explicar que los aislamientos de *Fusarium* spp. usan estos metabolitos como mecanismo de captación de hierro.
- La producción de sideróforos para los doce aislamientos en el ensayo en placa y para la mayoría de estos en medio líquido, evidenció que no hay relación entre la producción de estas moléculas y el origen del aislamiento o la especie. Igualmente no se obtuvo una relación entre la producción de sideróforos en ambos ensayos y el desarrollo en condiciones limitantes de hierro.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agrios G (1995) Fitopatología. Editorial Limusa.

Arnou E (1937) Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. Laboratory of physiological chemistry, University of Minnesota, Minneapolis 531-537.

Atkin C, Neilands J, Phaff H (1970) Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. *Journal of Bacteriology* 103 (3): 722-733.

Caballero J, Lemus J, Estrada P, Martínez L (2007). The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 308–5319.

Casadevall A (2007). Determinants of virulence in the pathogenic fungi. *Fungal Biology Reviews*. 21(4): 130–132.

Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, et al. (2006). Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *The Journal of the American Medical Association* 296(8):953-963.

Di Pietro A, González I (2004) *Fusarium oxysporum*: un modelo para el análisis de la patogénesis fúngica en plantas y humanos. Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología. 37: 6-13.

Di Pietro A, Madrid M, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero M (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology* 4(5): 315-325.

Di Pietro A, García-MacEira F, Męglec E, Roncero M (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular microbiology* 39(5):1140-52

Dutta S, Kundu M, Chakraborty S, Ojha J, Chatterjee, N (2006) Production and Optimization of Fe (III) Specific Ligand, the Siderophore of Soil Inhabiting and Wood Rotting Fungi as Deterrent to Plant Pathogens. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 41(3): 237-248.

Evans J, Levesque D, Lahunta A, Jensen E (2004). Intracranial Fusariosis: A Novel Cause of Fungal Meningoencephalitis in a Dog. *Veterinary Pathology* 41:510–514.

Franco-Correa M, Quintana A, Duque C, Suárez C, Rodríguez M et al (2010) Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* 45:209-217.

Fraser R, Creanor J (1974) Rapid and selective inhibition of RNA synthesis in yeast by 8-hydroxyquinoline. *European journal of biochemistry* 46:67-73.

Garisto B, Gibson D, Krasnoff S (2015). Intracellular siderophore but not extracellular siderophore is required for full virulence in *Metarhizium robertsii*. *Fungal Genetics and Biology* 82: 56-68.

Geng Z, Zhu W, Su H, Zhao Y, Zhang K, et al. (2014). Recent advances in genes involved in secondary metabolite synthesis, hyphal development, energy metabolism and pathogenicity in *Fusarium graminearum* (teleomorph *Gibberella zeae*). *Biotechnology Advances* 32: 390-402.

Godoy P, Cano J, Gené J, Guarro J, Höfling-Lima A, et al. (2004). Genotyping of 44 Isolates of *Fusarium solani*, the Main Agent of Fungal Keratitis in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 42(10): 4494–4497.

Goetz D, Holmes M, Borregaard N, Bluhm M, Raymond K et al (2002) The Neutrophil Lipocalin NGAL Is a Bacteriostatic Agent that Interferes with Siderophore-Mediated Iron Acquisition. *Molecular Cell* 10(5): 1033-1043.

Haas H, Eisendle M, Turgeon G (2008). Siderophores in Fungal Physiology and Virulence. *The Annual Review of Phytopathology* 46:149-187.

Hansen F, Sorensen J, Giese H, Sondergaard T, Frandsen R (2012). Quick guide to polyketide synthase and nonribosomal synthetase genes in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 155:128-136.

Heui S, Lim Y, Lee S, Woong N, Rhee J (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal Microbiological Methods* 44(1):89-95.

Hoyos-Carvajal L, Orduz S, Bissett J (2009) Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological control* 51(3): 409-416.

Howard D (1999). Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 394–404.

Johnson L (2008). Iron and siderophores in fungal–host interactions. *Mycological Research* 112: 170-183.

Leslie J, Summerel B (2006) The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing Sydney, Australia.

Lin H, Chu P, Kou Y, Shen S (2005) Clinical experience in managing *Fusarium solani* keratitis. *The international journal of clinical practice* 59: 549–554.

López-Bergel M, Capilla J, Turrá D, Shafferer L, Matthijs S et al (2012). HapX-Mediated Iron Homeostasis Is Essential for Rhizosphere Competence and Virulence of the Soilborne Pathogen *Fusarium oxysporum*. *The Plant Cell* 24:3805-3822.

López-Berges M, Hera C, Sulyok M, Schäfer K, Capilla J et al (2013) The velvet complex governs mycotoxin production and virulence of *Fusarium oxysporum* on plant and mammalian hosts. *Molecular Microbiology* 87(1): 49-65.

López-Erassquín E, González M, Callejas C, Vázquez C (2006) A novel MFS transporter encoding gene in *Fusarium verticillioides* probably involved in iron-siderophore transport. *Mycological research* 110: 1102–1110.

Machuca A, Milagres A (2003). Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology* 36(3): 177-181.

Machuca A, Pereira G, Aguiar A, Milagres A (2007) Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. *Letters in Applied Microbiology* 44:7-12.

Madrid M, Di Pietro A, Roncero M (2002). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Molecular Microbiology* 47(1): 257-266.

Matić S, Spadaro D, Prella A, Gullino M, Garibaldi A (2013). Light affects fumonisin production in strains of *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium verticillioides* isolated from rice. *International Journal of Food Microbiology* 166: 515-523.

Milagres A, Machuca A, Napoleão D (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods* 37(1): 1-6.

Mills D (1978). 8-Hydroxyquinoline inhibition of DNA synthesis and intragenic recombination during yeast meiosis. *Molecular and general genetics* 162(2): 221-228.

Mossialos D, Amoutzias G (2009). Role of siderophores in cystic fibrosis pathogenesis: Foes or friends?. *International Journal of Medical Microbiology* 299(2): 87-98.

Mouralian C, Buss JL, Stranix B, Chin J, Ponka P (2005). Mobilization of iron from cells by hydroxyquinoline-based chelators. *Biochemical Pharmacology* 71(1-2):214-222.

Neilands J (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *The journal of biological chemistry* 270: 26723-26726.

Nelson P, Dignani M, Anaissie J (1994) Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7(4): 479-504.

Nesic K , Ivanovic S, Nesic V (2014). Fusarial toxins: secondary metabolites of *Fusarium* fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 228: 101-120.

Oide S, Berthiller F, Wiesenberger G, Adam G, Turgeon G (2015) Individual and combined roles of malonichrome, ferricrocin, and TAFC siderophores in *Fusarium graminearum* pathogenic and sexual development. *Frontiers in Microbiology* 5:759.

Oide S, Moeder W, Haas H, Krasnoff S, Gibson D, et al. (2006). NPS6, encoding a non-ribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* 18:283–53.

Oide S, Krasnoff S, Gibson D, Turgeon B (2007). Intracellular siderophores are essential for ascomycete sexual development in heterothallic *Cochliobolus heterostrophus* and homothallic *Gibberella zeae*. *Eukaryot Cell* 6(8): 1339–1353.

Ortoneda M, Guarro J, Madrid M, Caracuel Z, Roncero M (2004) *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in Plants and Mammals. *Infection and Immunity* 72(3) 1760-1766.

Osso M, Royet X (2008). Evaluación de la producción de sideróforos asociados a factor de patogenicidad en *Fusarium* spp. Aislados de lesiones en humanos, animals y plantas. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana.

Pekkarinen A, Mannonen L, Jones B, Niku-Paavola M (2000) Production of Proteases by *Fusarium* Species Grown on Barley Grains and in Media Containing Cereal Proteins. *Journal of cereal science* 31(3): 253-261.

Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera L, Fernández F (2007) O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of microbiological methods* 70: 127-

131.

Pierre J, Baret P, Serratrice G (2003) Hydroxyquinolines as Iron Chelators. *Current Medicinal Chemistry* (10):1077-1084

Prados R, Serena C, Delgado J, Guarro J, Di Pietro A (2006) Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on mammalian hosts. *Microbes and infection* 8(14-15):2825-2831

Radzki W, Gutiérrez J, Algar E, García J, García A, et al.(2013) Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoe* 104:321–33

Renshaw J, Livens F, Robson G, Collison D, Taylor , et al. (2002) Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycological Research* 06(10): 1123–1142.

El-Samra A, Amer M, Abd-El-Hamid M, El-Saadani M, Kabeil S, et al (2009) Tomato Varietal Response to *Alternaria solani* and *Fusarium solani* Infection. *World Journal of Agricultural Sciences* 5(6): 737-745.

Salah H, Al-Hatmi A, Theelen B, Abukamar M, Hashim S, et al (2015). Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. *Journal of Infection* 71: 658-666.

Schwyn B, Neilands J (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Analytical Biochemistry* 160: 47-56.

Szebesczyk A, Olshvang E, Shanzec A, Carver P, Gumienna-Kontecka E (2016) Harnessing the power of fungal siderophores for the imaging and treatment of human diseases. *Coordination Chemistry Reviews* In Press

Sella L, Gazzetti K, Faoro F, Odorizzi S, D'Ovidio R, et al. (2013). A *Fusarium graminearum* xylanase expressed during wheat infection is a necrotizing factor but is not essential for virulence. *Plant Physiology and Biochemistry* 64: 1-10.

Silva-Stenico M, Pacheco F, Rodrigues J, Carrilho E, Tsai S (2005) Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiological Research* 160(4):429-436.

Shin S, Lim Y, Lee S, Yang N, Rhee J (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiology Methods* 44:89-95.

Shinton W (2014) The Biology of Fungi Impacting Human Health. *Partridge*. pp 170.

Symeonidis A (2009) The role of iron and iron chelators in zygomycosis. *Clinical microbiology and infection* 15(5): 26-32.

Szanişzlo P (2013) Fungal dimorphism: with emphasis on fungi pathogenic for humans. Plenum press NY, USA.

Tobiasen C, Aahman J, Ravnholt K.S, Bjerrum M.J, Grell M.N, et al (2007) Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as the producer of ferricrocin. *Curr Genet* (51):43–58.

Validandi V, Rupula K, Rao S, Deshpande V (2009) Purification and characterization of mycoferritin from *Fusarium verticillioides* MCR 826. *Biometals* 22:1063-1073.

Venturini G, Assante G, Toffolatti S, Vercesi A (2013). Pathogenicity variation in *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in northern Italy. *Mycoscience* 54: 285-290.

Wanjiru W, Zhensheng K, Buchenauer H (2002). Importance of Cell Wall Degrading Enzymes Produced by *Fusarium graminearum* during Infection of Wheat Heads. *European Journal of Plant Pathology* 108(8): 803-810.

Winkelmann G (1992) Structures and functions of fungal siderophores containing hydroxamate and complexone type iron binding ligands. *Mycological Research* 96(7):529-534

Yamamura Y, Shim WB (2008) The coiled-coil protein-binding motif in *Fusarium verticillioides* Fsr1 is essential for maize stalk rot virulence. *Microbiology* (154) 1637–1645

Yang J, Goetz D, Li J, Wang W, Mori K et al (2002) An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin. *Molecular Cell* 10(5): 1045-156.

Ying S, Y Feng M (2004) Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology* 97: 323–331.

Yong-Sung P, Ji-Hyun K, Jin-Hwa C, Hyo-Ihl C, Seung-Wook K, et al (2007) Physical and functional interaction of FgFtr1–FgFet1 and FgFtr2–FgFet2 is required for iron uptake in *Fusarium graminearum*. *Biochemical Journal* 408: 97-104.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Preparación de reactivos y curvas de calibración para cuantificación de sideróforos

▪ CUANTIFICACIÓN DE SIDERÓFOROS TOTALES

Preparación de reactivos:

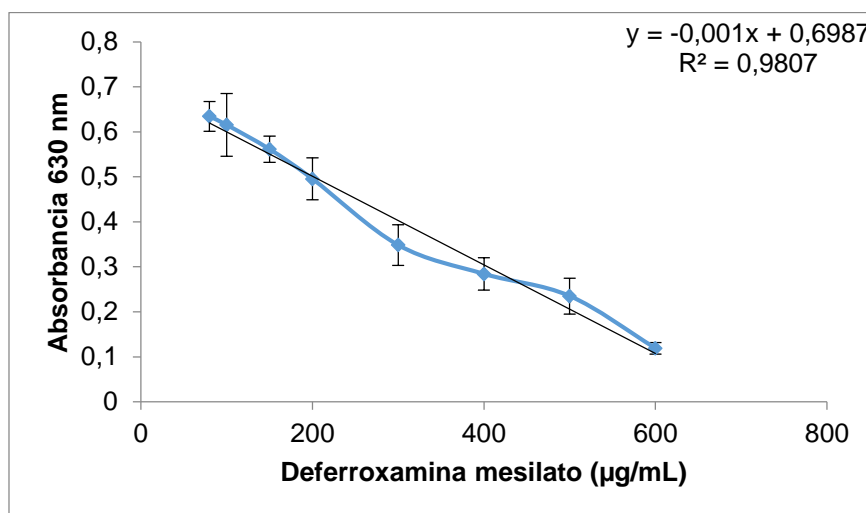
Reactivo CAS líquido modificado (Schwyn & Neilands, 1987):

Componentes	mL/L
1mM FeCl ₃ · 6H ₂ O (10mM HCl)	1,5
Solución acuosa CAS 2mM	7,5
CTAB 10mM (1,82mg/L)	6

Mezclar lentamente las soluciones de 6H₂O y CTAB. Posteriormente, esta se agita y se agrega lentamente a la solución acuosa CAS. Mantener esta solución en oscuridad.

▪ Curva de calibración de sideróforos totales

A partir de un stock de Deferroxamina mesilato de 10mg/mL se preparó un stock de 1mg/mL, con el cual se realizó la curva.



▪ Reacción colorimétrica de la curva de sideróforos totales



- **Técnica para la cuantificación de sideróforos totales (Schwyn & Neilands, 1987):**
(Volumen final de reacción: 1mL)

1. A 0,5mL de la muestra, adicionar 0,5mL del reactivo CAS líquido modificado.
2. Homogenizar con vortex y mantener a temperatura ambiente durante 30 minutos.
3. Realizar lectura de absorbancia a 630nm en espectrofotómetro GENESYSTEM 10 UV de barrido, Referencia: 335906.

El blanco de lectura, corresponde a la mezcla de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10mM HCl) y CTAB, reemplazando el volumen de la solución CAS (Chromo Azurol S) por agua destilada.

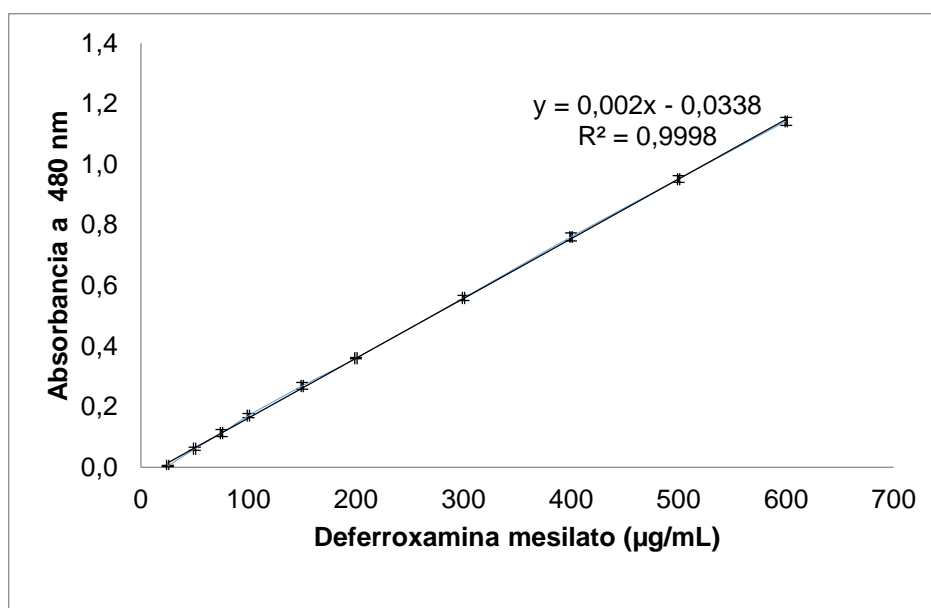
- **CUANTIFICACIÓN SIDERÓFOROS TIPO HIDROXAMATO**

Preparación de reactivos:

Reactivo Atkin (1970):

5mM $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ en 0,14M HClO_4 (Ácido perclórico)

- **Curva de calibración de sideróforos tipo hidroxamato**



- **Reacción colorimétrica de la curva de sideróforos tipo hidroxamato**



- **Técnica modificada para la cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato (Atkin et al., 1970):**

(Volumen final de reacción: 1 ml)

1. A 0,5mL de la muestra, se le adiciona a 0,5mL del reactivo de Atkin.
2. Homogenizar con Vortex y leer a una absorbancia de 480nm en espectrofotómetro GENESYSTEM 10 UV de barrido, Referencia: 335906.

El blanco de lectura, se realiza con 0,5mL del reactivo de Atkin y 0,5mL de agua destilada.

- **CUANTIFICACIÓN DE SIDERÓFOROS TIPO CATECOLATO**

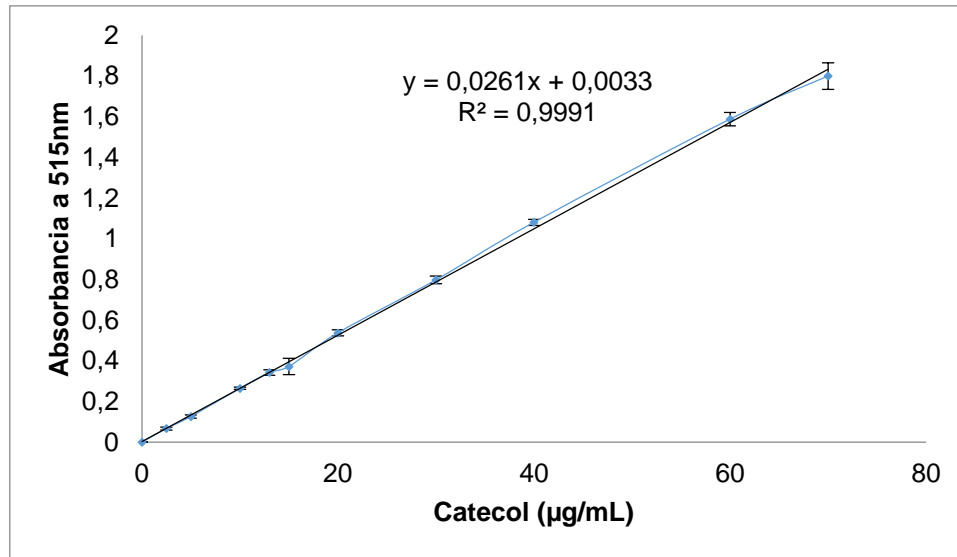
Preparación de reactivos:

Reactivo catecolato (Arnow, 1937):

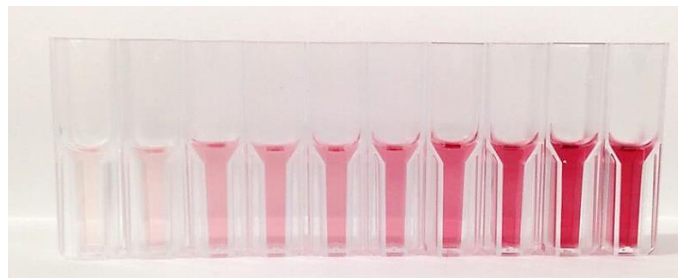
1. HCl 0,5N
2. NaOH 1N
3. Reactivo molibdato ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)/nitrito (NaNO_2) 10g de cada uno en 100mL de agua destilada.

- **Curva de calibración de sideróforos tipo catecolato**

Se preparó una solución patrón de catecol a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de este stock se realizaron diluciones para la preparación de las diferentes concentraciones para la curva de calibración.



- **Reacción colorimétrica de la curva de sideróforos tipo catecolato**



- **Técnica para la cuantificación de sideróforos tipo catecolato (Arnow, 1937):**

(Volumen final de reacción: 2,5mL)

1. A un 0,5mL de la muestra se le agrega 0,5mL de HCl 0,5N
2. A la mezcla anterior, adicionar 0,5mL del reactivo de molibdato/nitrito (se debe observar una coloración amarilla intensa).
3. Añadir 0,5mL de NaOH (1N) (se observa un cambio de color a rojo cereza).
4. Se agrega 0,5mL de agua destilada.
5. Finalmente, tras homogenizar, se realiza la lectura a una longitud de onda de 515nm en espectrofotómetro GENESYSTEM 10UV de barrido, Referencia: 335906

El blanco de lectura es: 0,5mL de HCl 0,5N + 0,5mL del reactivo de molibdato/nitrito + 0,5mL de NaOH + 1mL de agua destilada

Anexo 2. Análisis de varianza - ANOVA

- Análisis de varianza de la producción semicuantitativa de sideróforos en medio CAS-CAA placa por parte del *Fusarium graminearum*.

Datos de área bajo la curva:

ANOVA

ABCCAS *F. graminearum*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5229,662	6	871,610	103,710	,000
Intra-grupos	235,320	28	8,404		
Total	5464,981	34			

ABCCAS *F. graminearum*

	tmtOHQ	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
Duncana,b	40	5	3,5000			
	50	5	3,5000			
	30	5	7,3460	7,3460		
	20	5		10,8180		
	10	4			25,3100	
	5	3				31,1533
	0	8				32,3300
	Sig.		,065	,079	1,000	,541

- Análisis de varianza de la producción semicuantitativa de sideróforos en medio CAS-CAA placa por parte de los 12 aislamientos de *Fusarium spp.*

Datos de área bajo la curva:

ANOVA

ABCCAS

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	50,777	11	4,616	8,477	,000
Intra-grupos	24,505	45	,545		
Total	75,282	56			

ABCCAS

TMTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Duncana,b 409	5	6,2350				
406	5	6,9400	6,9400			
319	5		7,3900	7,3900		
404	5		7,4600	7,4600		
162	5			8,2450	8,2450	
201	4			8,3375	8,3375	
314	5			8,3625	8,3625	
205	4			8,4063	8,4063	
203	5			8,4150	8,4150	
310	5				8,7900	8,7900
161	4				9,0906	9,0906
108	5					9,7875
Sig.		,150	,315	,070	,135	,055

- **Análisis de varianza de la producción cuantitativa de sideróforos en medio Simon y Tessman (1963)**

Cuantificación de sideróforos totales:

ANOVA

Totales

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2226742,764	11	202431,160	223,740	,000
Intra-grupos	82333,131	91	904,760		
Total	2309075,895	102			

Totales

Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Duncana,b 319	9	,000							
409	5	15,100							
406	6		118,867						
314	9			158,033					
404	8			172,825					
162	6				263,033				
310	12				286,533	286,533			
205	9					303,589	303,589		
203	9						327,811		
201	9							376,478	
161	9							378,144	
108	12								506,867
Sig.		,317	1,000	,327	,121	,258	,110	,912	1,000

Cuantificación de sideróforos tipo hidroxamato:

ANOVA

Hidroxamatos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	71568,486	11	6506,226	34,510	,000
Intra-grupos	21303,906	113	188,530		
Total	92872,392	124			

Hidroxamatos

Aislamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Duncana,b 108	11	43,0818					
409	9	47,9000					
404	9	55,2889	55,2889				
314	12		66,4000	66,4000			
319	9		67,6222	67,6222			
161	12			72,8167	72,8167		
162	10			73,2500	73,2500		
406	11				84,1273		
205	9				85,7333		
310	9					103,8444	
203	12					108,9833	
201	12						122,5250
Sig.		,059	,056	,310	,053	,399	1,000

- **Análisis de varianza del área bajo la curva del crecimiento en diferentes concentraciones de 8-hidroxiquinolina.**

ANOVA

PICRHQ

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1721,423	11	156,493	15,568	,000
Intra-grupos	482,504	48	10,052		
Total	2203,926	59			

Área bajo la curva *F. gramineraum*

tmttoHQ	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Duncan, b					
40	5	3,5000			
50	5	3,5000			
30	5	7,3460	7,3460		
20	5		10,8180		
10	4			25,3100	
5	3				31,1533
0	8				32,3300
Sig.		,065	,079	1,000	,541

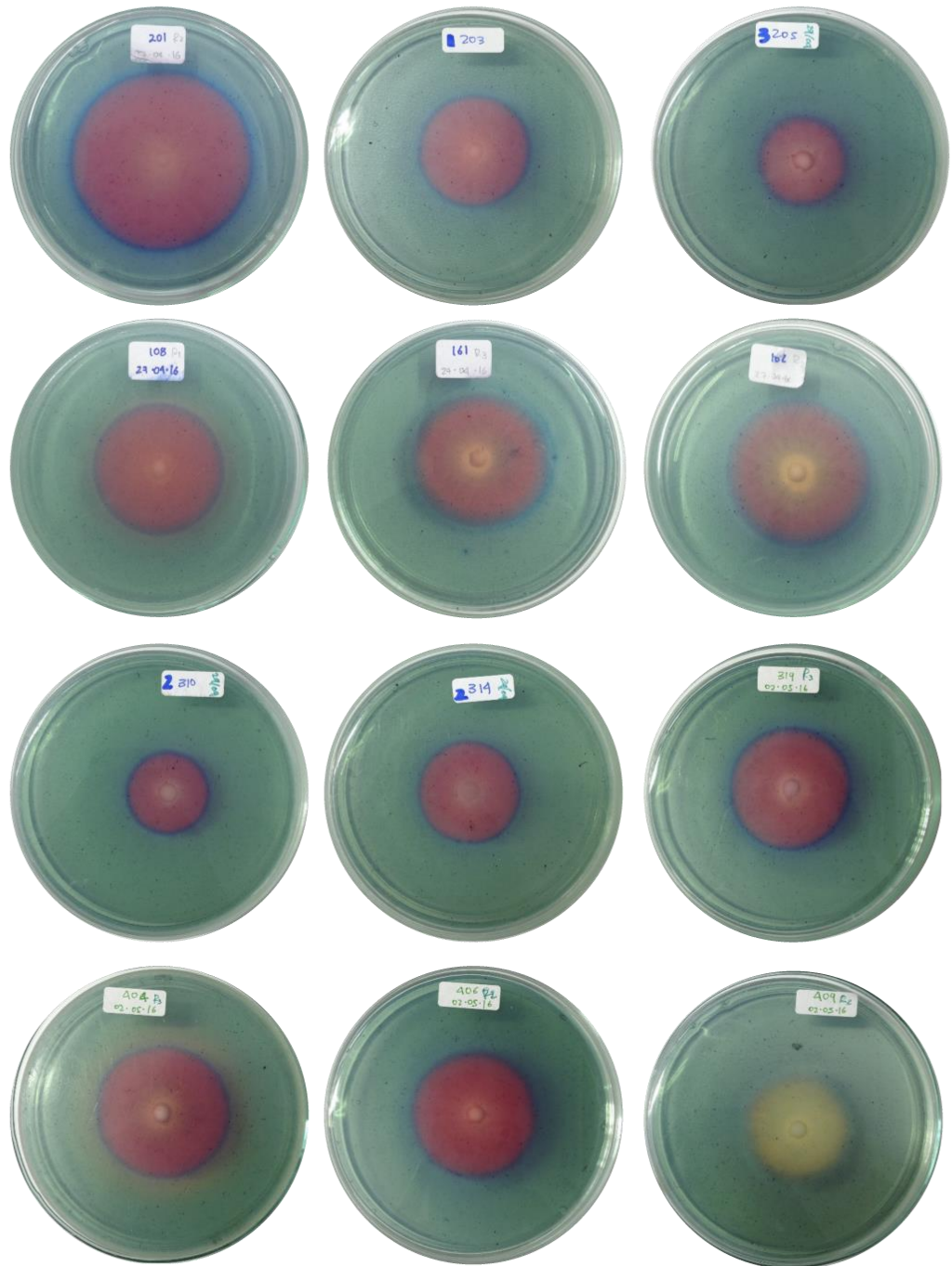
- **Análisis de varianza del porcentaje de inhibición del crecimiento radial a 20mg/L de hidroxiquinolina**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	5229,662	6	871,610	103,710	,000
Intra-grupos	235,320	28	8,404		
Total	5464,981	34			

PICRHQ

		Subconjunto para alfa = 0.05					
TMTO	N	1	2	3	4	5	6
Duncana 161	5	61,7212					
310	5	61,9129					
201	5	64,3788	64,3788				
205	5		67,7083	67,7083			
203	5		68,1912	68,1912	68,1912		
162	5		68,3293	68,3293	68,3293		
409	5			69,8851	69,8851		
108	5			71,8827	71,8827	71,8827	
406	5				72,5671	72,5671	
314	5					75,1067	
319	5					75,4354	
404	5						80,1144
Sig.		,218	,077	,068	,055	,112	1,000

▪ Anexo 3. Ensayo semicuantitativo CAS placa + sales Simon y Tessman



Anexo 4. Medios de cultivo

- Medio CAS-CAA (Caballero et al. 2007): preparación para 1L

COMPONENTE			
Solución 1: 900mL		Solución 2: 100mL	
Glucosa	2 g/L	A) Solución acuosa CAS (6,05g/L)	10 mL
Manitol	2 g/L		
NH ₄ Cl	1,1 g/L	B) CTAB (7,29g/L)	10 mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,9 g		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25g	C) 1mM FeCl ₃ .6H ₂ O (10mM HCl)	10 mL
Agar	15g/L		

Preparación:

Solución 1:

Aforar con agua destilada y disolver cada uno de los componentes, ajustar a pH a 6,8.

Solución 2:

Mezclar lentamente las soluciones A y C; posteriormente, esta mezcla se agrega y se agita paulatinamente a la solución de CTAB y se afora en un balón de 100 mL. Mantener esta solución en oscuridad.

Mezclar la solución 1 y 2, autoclavar a 15lb de presión y 121°C. Finalmente, dejar enfriar el medio hasta obtener temperatura aproximadamente de 45°C y servir en cajas de petri.

- Medio extracto malta control.

COMPONENTES	g/L
Glucosa	4
Extracto de levadura	10
Extracto de malta	4
Agar	15

- Medio extracto de malta suplementado con hidroxiquinolina (20mg/L)

COMPONENTES	g/L
Glucosa	4
Extracto de levadura	10
Extracto de malta	4
Agar	15
Hidroxiquinolina	0,02

Preparación:

Aforar con agua destilada y disolver cada uno de los componentes, posteriormente se adiciona la solución de hidroxiquinolina (10mg/L) y se autoclava (15lb de presión y 121°C9). Finalmente, se deja enfriar el medio hasta obtener una temperatura aproximadamente de 45°C y se sirve en cajas de petri.

- Medio PDA

COMPONENTES	g/L
Extracto de papa	4
Glucosa	20
Agar-agar	15

- Medio Simon & Tessman modificado (Simon & Tessman, 1963)

Componentes	g/L
Glucosa	2
Manitol	2
Cloruro de sodio (NaCl)	5,8
Cloruro de potasio (KCl)	3,7
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,15
Tris-HCl	12,1
Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	0,1
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl)	1,1
Sulfato de sodio dibásico (Na ₂ SO ₄)	0,142
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0,272

Aforar con agua destilada y disolver cada uno de los componentes, ajustar a pH a 7,4.

- Medio Simon & Tessman modificado (Simon & Tessman, 1963) + Solución 2 CAS-CAA: Preparación para 1L

Componentes			
Solución 3: 900mL	g/L	Solución 2: 100 mL	
Glucosa	2	A) Solución acuosa CAS (6,05g/L)	10
Manitol	2		
Cloruro de sodio (NaCl)	5,8		
Cloruro de potasio (KCl)	3,7	B) CTAB (7,29g/L)	10
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,1		
Tris-HCl	12,		
Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	0,1		
Cloruro de amonio (NH ₄ Cl)	1,1	C) 1mM FeCl ₃ .6H ₂ O (10mM HCl)	10
Sulfato de sodio dibásico (Na ₂ SO ₄)	0,1		
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	0,2		

Preparación:

Solución 1:

Aforar con agua destilada y disolver cada uno de los componentes, ajustar a pH a 7,4.

Solución 2:

Mezclar lentamente las soluciones A y C; posteriormente, esta se agrega y se agita paulatinamente a la solución de CTAB y se afora en un balón de 100 mL. Mantener esta solución en oscuridad.

Mezclar la solución 3 y 2, autoclavar a 15lb de presión y 121°C. Finalmente, dejar enfriar el medio hasta obtener temperatura aproximadamente de 45°C y servir en cajas de petri.