



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE  
PREGRADO

“Identificación de genes codificantes para sintetasas  
de péptidos no ribosomales sideróforas y sus  
potenciales metabolitos en el hongo Antártico  
*Pseudogymnoascus* 131209-E2A-C5II-EB”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en  
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de  
Ingeniera en Biotecnología Molecular

**Anaí Rallen Díaz Morales**

Director del Seminario de Título: Dra Inmaculada Vaca Cerezo

JUNIO 2022

Santiago, Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Sra

**Anaí Rallen Díaz Morales**

“Identificación de genes codificantes para sintetasas de péptidos no ribosomales sideróforas y sus potenciales metabolitos en el hongo Antártico *Pseudogymnoascus* 131209-E2A-C5II-EB”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

**Directora Seminario de Título:**

*Dra. Inmaculada Vaca C.*

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:**

*Dra Jennifer Alcaíno G.*

**Evaluador:**

*Dr Nicolás Guilliani.*

Santiago de Chile,

## BIOGRAFÍA



Llegué a este mundo el domingo 4 de Julio del 1993. Segunda hija para el matrimonio María Morales y Nelson Díaz. Mis padres me criaron con mucho amor en la ciudad de Santiago, transitando de hogar entre diversas comunas a lo largo de mi vida hasta finalmente establecernos en Puente Alto. Desde pequeña fui muy curiosa y estudiosa, realmente disfrutaba aprender y tenía interés en muchas cosas. Debido a esto, siempre me costó decidir en qué enfocarme y transité entre querer ser médica, abogada, geóloga y profesora. Finalmente, cuando conocí la biotecnología mediante un curso de verano importado por la Universidad de Chile, decidí tajantemente que quería ser biotecnóloga de esta casa de estudios y, aunque mi vida ha dado muchas vueltas, nunca me arrepentiré de esta decisión. Esta experiencia me entregó gran conocimiento científico y humano, vivencias inolvidable y gente que espero que este presente por siempre en mi camino. Actualmente, se encuentro emprendiendo mi segundo proyecto, ser una médica con base científica y potenciar ambas profesiones para contribuir, con corazón y mente, a las personas.

## DEDICATORIA

Este seminario de título se lo dedico a mi familia, por todo su apoyo incondicional y motivación constante en perseguir mis sueños y seguir adelante.

## AGRADECIMIENTOS

Quería partir agradeciendo a mi familia, por estar siempre apoyándome, guiándome y dándome el espacio para desarrollarme como científica y adulta. A mi papá, por ser un ejemplo de perseverancia, logros y determinación. A mi madre, por ser un soporte esencial y siempre recordarme de disfrutar y aprovechar al máximo todas las experiencias. A mi hermano también por su buena onda y apoyo. La verdad es que nada de esto habría sido posible sin ellos.

Gracias a mi tutora, guía y modelo a seguir. La verdad es que formar parte de su laboratorio y trabajar con ud, Profe Inma, me ha entregado el placer de conocer una científica y persona excepcional y realmente agradezco todos los años en que pude crecer, aprender, trabajar y compartir, tanto a nivel profesional y personal.

Me gustaría agradecerle a mis amigos y compañeros de laboratorio por ser un pilar de motivación, trabajo y, más importante aun, generar un lugar cariñoso, seguro y enriquecedor. Particularmente, quiero agradecer a Pablo, Mariana, Vicente y Diego por ser seres grandiosos, científicos motivados y grandes amigos, a quienes valoro y valoraré por siempre. Sobre todo a ti Vicente, tu bondad, optimismo, compromiso me hacen sentirme honrada de poder haber trabajado codo a codo contigo.

A mis grandes amigas que hice desde primer año, Javiera y Camila, gracias por ser mis compañeras todo terreno. A mi gran amiga Eva, compañera de trabajos y actividades extracurriculares. Agradezco tu compañía, apoyo y motivación en todo este proceso. Así también, a María Paz, quién siempre me inspiró con su gran inteligencia y perseverancia. A Martín, por brindarme infinito amor y apoyo durante la parte más crítica de este proceso.

A todos mis amigos, por darme excelentes momentos de risa, aprendizaje y, simplemente, felicidad. Particularmente, a mis eternas amigas Isabel, Paula, Mariana, Denisse y Romina con quienes ha sido un placer crecer y acompañarnos en todos los procesos de la vida. Finalmente, me gustaría agradecer a mi tata, el químico, el científico loco. Me hubiese gustado mucho compartir esto contigo, pero sé que estas y que me acompañaste durante todo este proceso.

**Financiamiento:** Proyecto Fondecyt 1150894

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
El gran potencial de los metabolitos secundarios de origen fúngico .....	5
Sideróforos de origen fúngico .....	6
Biosíntesis de sideróforos fúngicos de tipo hidroxamato .....	9
Transporte de sideróforos fúngicos .....	13
Organización y regulación de clusters génicos de sideróforos fúngicos .....	14
Sideróforos de organismos fúngicos que habitan ambientes extremos .....	14
Producción de sideróforos en el género fúngico <i>Pseudogymnoascus</i> .....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
1 Análisis bioinformático .....	17
2 Material biológico .....	18
2.1 Cepa fúngica .....	18
2.2 Material de trabajo .....	19
3 Fermentaciones .....	19
3.1 Medios de cultivo .....	19

3.2 Fermentaciones de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB en distintos medios .....	20
3.3 Fermentaciones de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB en medio M9 con y sin Fe <sup>+3</sup> .....	21
4. Ensayo CAS .....	21
5. Ensayo del cloruro férrico .....	22
6. Cromatografía en capa fina .....	22
7. Extracción de ARN desde micelio .....	23
7.1 Generación de ADN complementario (ADNc) .....	24
7.2 PCR .....	24
8. Análisis químico de los caldos de las fermentaciones de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB.....	25
8.1 Preparación de muestras desde los caldos de cultivo para análisis por HPLC	25
8.2 Análisis de muestras mediante HPLC analítico .....	26
8.3 Purificación de potenciales compuestos sideróforos .....	27
8.4 Análisis de espectrometría de baja y alta resolución y resonancia magnética nuclear.....	28
RESULTADOS .....	29
1 Análisis bioinformático y búsqueda de genes codificantes para enzimas NRPS y genes implicados en la síntesis de sideróforos en la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB.....	29

3 Evaluación de la expresión del gen <i>gymE</i> y de la presencia de sideróforos en medios de cultivo con y sin Fe+3.....	47
4 Separación de compuestos sideróforos en cromatografía en capa fina .....	50
5 Análisis de los caldos de las fermentaciones de la cepa <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante HPLC .....	52
6 Purificación de potenciales compuestos sideróforos .....	54
7. Análisis de espectrometría de masas de alta resolución.....	57
DISCUSIÓN.....	58
Identificación y análisis de genes codificantes de enzimas NRPSs sideróforas y otros genes posiblemente implicados en la biosíntesis de estos compuestos .....	59
Estudio de la producción de compuestos sideróforos y su conexión con el potencial genético identificado en <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB.....	70
Purificación de compuestos sideróforos producidos por <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB.....	74
CONCLUSIONES .....	78
ANEXO .....	80
REFERENCIAS .....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores utilizados para la reacción de PCR del gen <i>gymE</i> y el gen de la betatubulina. ....	25
--	----

Tabla 2. Parámetros de cultivo y tratamiento químico evaluados para optimizar la presencia de compuestos sideróforos en las muestras analizadas por HPLC.....	26
Tabla 3. Protocolo de elución por HPLC analítico para determinación de sideróforos..	27
Tabla 4. NRPSs identificadas en el genoma de <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante antiSMASH .....	30
Tabla 5. Resultados del análisis por BLASTx de las secuencias nucleotídicas de GymA y GymE.....	31
Tabla 6. Resultados del análisis por antiSMASH y BLASTx del clúster génico de GymA y los marcos de lecturas abiertos identificados en la región.....	32
Tabla 7. Resultados del análisis por antiSMASH y BLASTx del cluster génico de GymE y los marcos de lecturas abiertos identificados en la región.....	34
Tabla 8. Resultados del análisis por BLASTx de las secuencias del metabolismo de obtención de hierro por sideróforos identificadas en <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB utilizando genes de <i>A. fumigatus</i> . ....	38
Tabla 9. Resultados del análisis por BLASTx de las secuencias del metabolismo de obtención de hierro por sideróforos identificadas en <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB utilizando genes de <i>P. destructans</i> . ....	39
Tabla 9. Resumen de compuestos identificados .....	58
Tabla 10. Clases de NRPSs involucradas en la biosíntesis de sideróforos de tipo ferricromos. Se describe la organización modular que las caracteriza y proporcionan ejemplos de organismos fúngicos donde se han descrito. ....	60
Tabla 11. Resumen posibles funciones de secuencias génicas que no formaban parte de los clusters génicos descritos .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Subclases de sideróforos fúngicos de tipo hidroxamatos .....	9
Figura 2. Ruta de biosíntesis de sideróforos en <i>A. fumigatus</i> .....	10
Figura 3. Comparación de clusters génicos fúngicos de sideróforos intracelulares con el cluster de <i>gymA</i> . Los números indicados bajos los genes corresponden al número de gen del organismo evaluado. ....	41
Figura 4. Comparación de clusters génicos de sideróforos extracelulares fúngicos con el cluster de <i>gymE</i> . ....	43
Figura 5. Cultivos de <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB en tres medios líquidos diferentes para la producción de sideróforos. ....	45
Figura 6. Porcentaje de decoloración del caldo de cultivo de <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB en función de los días de fermentación.....	46
Figura 7. Cultivos de <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB para estudios genéticos y químicos de sideróforos. ....	48
Figura 8. Evaluación de la presencia de sideróforos mediante ensayos químicos colorimétricos en caldos de cultivo de <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 131209-E2A-C5II-EB en medio M9 suplementado con 25 $\mu$ M de $FeCl_3$ y medio M9 .....	49
Figura 9. RT-PCR del gen <i>gymE</i> en micelio colectado tras 5 y 8 días de cultivo y en medios con ausencia o presencia de .....	50
Figura 10. Cromatografía en capa fina para separación de sideróforos. ....	51
Figura 11. Proceso de purificación de sideróforos. ....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia nuclear magnética de protones
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bZIP	Dominio básico de cierre de leucina
CAS	Cromo azuroI S
CoA	Coenzima A
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
FAD	Favlin adenín dinucleótido
GATA	Factor de transcripción de unión a la secuencia GATA
HDTMA	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
MS	Metabolito secundario
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NRPS	Sintetasa de péptidos no ribosomales
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OSMAC	Una cepa muchos compuestos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pHMMs	Modelos ocultos de Márkov
RIA	Asimilación reductiva de hierro
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SITs	Transportadores de sideróforo-hierro
TAFC	Triacetil fusarinina C
TFA	Ácido trifluoroacético
XAD	Amberlita

## RESUMEN

Entre todos los metabolitos secundarios fúngicos, los sideróforos destacan por ser un grupo de compuestos con gran diversidad estructural y aplicabilidad en diversas industrias biotecnológicas. Es por ello que la búsqueda de nuevos compuestos de esta familia de péptidos no ribosomales supone gran interés científico. Particularmente, el estudio de compuestos sideróforos producidos por hongos de ambientes extremos se ha enfocado en levaduras o en géneros fúngicos ampliamente conocidos como, por ejemplo, *Aspergillus*. Así, el estudio de otros géneros que habitan ambientes extremos y que son mucho menos conocidos, como *Pseudogymnoascus*, alberga un gran potencial interesantemente desconocido. En nuestro laboratorio se está estudiando como cepa modelo, la cepa fúngica antártica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB. En ella se ha identificado un fragmento de 528 nucleótidos cuya secuencia evidenció un 63% de identidad con la de una sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) productora de sideróforos de *Aspergillus flavus*. En base a este antecedente, el objetivo de este trabajo fue identificar en *Pseudogymnoascus* 131209-E2A-C5II-EB genes codificantes de sintetasas de péptidos no ribosomales y determinar si alguno de estos genes pertenece a la ruta de biosíntesis de algún potencial compuesto sideróforo producido por este organismo. El análisis bioinformático realizado determinó la presencia de dos genes que potencialmente codifican NRPSs sideróforas: *gymA* y *gymE*. El gen *gymA* se sitúa en un potencial cluster con *sidA*, un gen clave para la biosíntesis de sideróforos intracelulares de tipo ferricromo. Por otro lado, *gymE* se organiza entorno a un cluster conteniendo genes similares a *sidJ*, *sidF*, *sidH*, *mirB* y *sit1*, todos ellos potencialmente implicados en el metabolismo de sideróforos extracelulares, y cuyo producto sideróforo resultante pertenece a la familia de las

fusarininas. En condiciones de cultivo deficientes en hierro se consiguió inducir la expresión del gen *gymE*, la cual se correlacionó con la presencia de compuestos sideróforos en el medio de cultivo. Finalmente, se purificaron 4 de estos compuestos de naturaleza siderófora que fueron caracterizados mediante espectrometría de masas y que no se encuentran registrados en las bases de datos, por lo que constituyen potenciales nuevos sideróforos de origen fúngico.

Como trabajo futuro, se espera realizar la determinación estructural de los sideróforos purificados en este trabajo, y correlacionar la presencia de compuestos en los perfiles metabólicos con la expresión del gen *gymA*.

## ABSTRACT

Among all the fungal secondary metabolites, the siderophores stand out as a group of compounds with great structural diversity and applicability in various biotechnological industries. Thus the search for new compounds from this family of non-ribosomal peptides is of great scientific interest. In particular, the study of siderophore compounds produced by fungi in extreme environments has been focused on yeasts or on widely known fungal genera such as *Aspergillus*. Therefore, the study of other genera that inhabit extreme environments and that are much less known, such as *Pseudogymnoascus*, harbors a great and interestingly unknown potential.

In our laboratory, the Antarctic fungal strain *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB is being studied as a model. In this strain, a fragment of 528 nucleotides has been identified whose sequence showed 63% identity with an NRPS that produces siderophores from *Aspergillus flavus*. Based on this background, the goal of this work was to identify non-ribosomal peptide synthetases encoding genes in *Pseudogymnoascus* 131209-E2A-C5II-EB and to determine if any of them could be involved in the biosynthesis pathway of any potential siderophore compound produced by this organism.

The bioinformatic analysis carried out determined the presence of two genes that encode potential siderophore NRPSs; *gymA* and *gymE*. The *gymA* gene is located in a potential cluster with *sidA*, a key gene for the biosynthesis of intracellular ferrichrome-type siderophores.

On the other hand, *gymE* is organized around a cluster containing genes similar to *sidJ*, *sidF*, *sidH*, *mirB* and *sit1*, all of them potentially involved in the metabolism of

extracellular siderophores, and whose resulting siderophore product belongs to the fusarinin family. Under iron-deficient culture conditions, the expression of the *gymE* gene was induced, which was correlated with the presence of siderophore compounds in the culture medium.

Finally, four siderophore compounds were purified and characterized by mass spectrometry, which are not registered in the databases, thus constituting potential new siderophores of fungal origin. In future work, it is expected to carry out the structural determination of the purified siderophores in this work, and also to correlate the presence of compounds in the metabolic profiles with the expression of the *gymA* gene.

## INTRODUCCIÓN

### **El gran potencial de los metabolitos secundarios de origen fúngico**

Los metabolitos secundarios (MS) son moléculas orgánicas, de bajo peso molecular y dispensables para el organismo productor. La presencia de estos compuestos supone ventajas y herramientas para la supervivencia en el ambiente natural de los organismos en cuestión (Katz & Baltz, 2016), tales como la protección UV, otorgada por la melanina. Aun cuando se conocen las posibles aplicaciones biotecnológicas y médicas de muchos de estos compuestos, en la gran mayoría la función específica en el medio natural aún no se ha determinado (Keller, 2019).

Del total de metabolitos secundarios microbianos descubiertos hasta el año 2017, cerca del 47% proviene de organismos fúngicos (Bills & Gloer, 2017), lo que revela la gran capacidad de producción metabólica que tienen los hongos para generar este tipo de compuestos.

Muchos agentes terapéuticos son o derivan de MS fúngicos, siendo claves en el desarrollo de terapias efectivas como agentes anticancerígenos, antibacterianos, inmunosupresores, entre otros, por lo que son compuestos de gran relevancia para los seres humanos. Así también, estos compuestos presentan aplicaciones ilimitadas en áreas como la agricultura, ecología, biología celular, entre otras (Bills & Gloer, 2017).

De todos los MS fúngicos, los sideróforos destacan por ser un grupo de compuestos cuya función para el organismo productor es bien conocida. El estudio de los sideróforos fúngicos es aún incipiente comparándolo con el de sideróforos bacterianos, por lo que aún no se han desarrollado usos biotecnológicos (Pecoraro et al., 2021). Sin embargo, al igual que los sideróforos bacterianos, se prevé que los sideróforos

fúngicos tienen un gran potencial de aplicabilidad. Algunos ejemplos de usos podrían ser para favorecer el crecimiento vegetal, como las pioverdinas que son sideróforos producidos por bacterias del género *Pseudomonas*, o para la remediación de metales pesados como la desferroxamina B, producido por *Streptomyces pilosus* (Saha et al., 2016).

### **Sideróforos de origen fúngico**

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre y es un componente esencial para muchos procesos biológicos, como la respiración celular y la síntesis de aminoácidos (Ghosh et al., 2020). A pesar de estar presente en gran cantidad en la naturaleza, se estima que la cantidad máxima de ion férrico libre en solución a pH biológico ronda los  $10^{-18}$  M, lo que es cerca de tres órdenes de magnitud menor a lo requerido por los organismos vivos (Řezanka et al., 2018). Esta situación de falta de disponibilidad de hierro ha forzado a los organismos a desarrollar diversas estrategias para asegurar la biodisponibilidad y captación de este elemento (Khan et al., 2018).

Hasta la fecha se han caracterizado, a nivel molecular, cuatro mecanismos de captación de hierro en hongos, siendo estos: a) Transporte de  $Fe^{+3}$  mediado por sideróforos, b) Sistemas de reducción extracelular de  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ , c) Captación por grupos heme y proteínas que lo contienen y d) Obtención desde transferrina, lactoferrina y ferritina (Haas et al., 2008). Los hongos suelen utilizar más de uno de estos mecanismos de captación de hierro en paralelo y rara vez una especie presenta los cuatro. De todos estos sistemas, uno de los más eficientes y prevalentes en todos los géneros fúngicos, es la obtención de hierro mediante la producción de sideróforos (Garnerin & Sonnet, 2017; Haas et al., 2008).

Los sideróforos son moléculas quelantes de ion férrico, con pesos moleculares inferiores a 10KDa y que son secretados por bacterias, hongos, plantas y mamíferos en condiciones de deficiencia de este elemento (Khan et al., 2018). Estos compuestos captan  $Fe^{+3}$  de las formas normalmente encontradas en los ambientes, es decir, como compuestos hidróxidos insolubles, fosfato férrico, citrato férrico, azúcares y glucósidos, entre otros (Haas, 2014). Los centros de unión de la mayoría de los sideróforos son hexadentados, compuestos por tres grupos ligandos bidentados dispuestos alrededor del ión metálico central en una geometría octaédrica que minimiza las repulsiones y dota a todo el complejo de elevada estabilidad (Hider & Kong, 2010).

De acuerdo con su naturaleza química, los sideróforos se agrupan en tres clases principales: i) Carboxilatos, ii) Catecolatos e iii) Hidroxamatos.

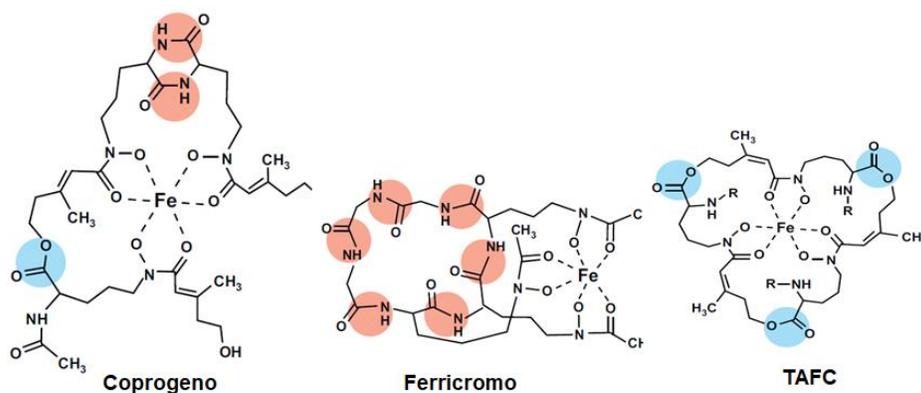
Los sideróforos de tipo carboxilatos han sido encontrados en hongos de la clase Zygomycetes y se caracterizan por contener grupos hidroxilo y carboxilo como grupos donantes para el  $Fe^{+3}$ . La rhizoferrina, sideróforo de tipo carboxilato aislado de *Rhizopus* spp. y otros del mismo género, contienen 1,4-diaminobutano simétricamente acilado al grupo carboxilato terminal de ácido cítrico mediante enlaces amida (Bhardwaj et al., 2021). Por otro lado, los sideróforos de tipo catecolatos consisten en moléculas con fenolatos o 2,3-dihidroxibenzoato (DHB) como grupos de unión al  $Fe^{+3}$ , los que además se encuentran unidos a aminoácidos. La lipofilia, la gran estabilidad química y la resistencia a pH ambientales son características únicas de este tipo de compuestos (Saha et al., 2016). Esta clase de sideróforos ha sido principalmente descrita en bacterias, pero también se han encontrado casos de presencia de sideróforos de tipo catecolato en hongos filamentosos. Por ejemplo, *Penicillium bilaii* produce pistillarina, un sideróforo de tipo catecolato extremadamente inusual (Holinsworth & Martin, 2009).

Los sideróforos de tipo hidroxamatos, corresponde a la clase de sideróforos más prevalente en los organismos fúngicos (Haas, 2014; Khan et al., 2018; Ghosh et al., 2020). Los sideróforos de tipo hidroxamato presentan carácter hidrofílico y son producidos además de por hongos, por bacterias. En el caso de los hongos, la síntesis de los hidroxamatos se basa en alquilaciones e hidroxilaciones de la ornitina. En ellos, el ligando bidentado se forma entre el  $\text{Fe}^{+3}$  y los dos oxígenos de cada grupo hidroxamato. Dentro de los hidroxamatos, existen tres subclases (Figura 1):

a) Ferricromos: Hexapéptidos cíclicos formados por tres unidades de N-acil-N-hidroxiornitina unidas mediante un enlace peptídico a 3 aminoácidos, siendo los dos primeros alanina, serina o glicina, mientras que el tercero es siempre glicina. Los grupos acil usualmente encontrados en esta subclase son acetil, malonil, cis- y trans-anhidromevalonil y trans- $\beta$ -metilglutaconil. La función específica de los ferricromos es almacenar intracelularmente el hierro (Garnerin & Sonnet, 2017).

b) Fusarininas: Estos sideróforos extracelulares pueden ser lineales o cíclicos. El monómero de este grupo de sideróforos se constituye por la cis-fusarinina [ $\delta$ -N-(5-hidroxi-3-metil-Z-2-pentenoil)- $\delta$ -N-hidroxi-L-ornitina], el cual es formado por la sustitución del grupo acil del grupo N5-hidroxi-N5-acilornitina con ácido cis-anhidromevalónico (5-hidroxi-3-metil-Z-2- ácido pentenoico) y supone el primer hidroxamato derivado de ornitina que no presenta un enlace peptídico. Los monómeros de fusarinina se conectan por un lábil enlace aminoacil-éster. El dímero cis de fusarinina corresponde a la fusarinina A, el trímero cis a la fusarinina B y el trímero cíclico se conoce como fusarinina C o fusígeno. Respecto a este último, el trímero cíclico trans, también conocido como TAFC, es el que muestra la mayor estabilidad química (Saleem et al., 2021).

c) Coprogenos: Estos hidroxamatos están ampliamente distribuidos y corresponden a sideróforos extracelulares. Se componen de tres unidades de N5-anhidromevalonil-N5-hidroxi-L-ornitina; dos de estas unidades forman un anillo de dicetopiperazina, mientras que la tercera unidad, está esterificada al grupo OH del extremo C-terminal del ácido dimérico. La diversidad estructural de esta clase de sideróforos radica en la metilación o acetilación del N2 (Haas, 2014).

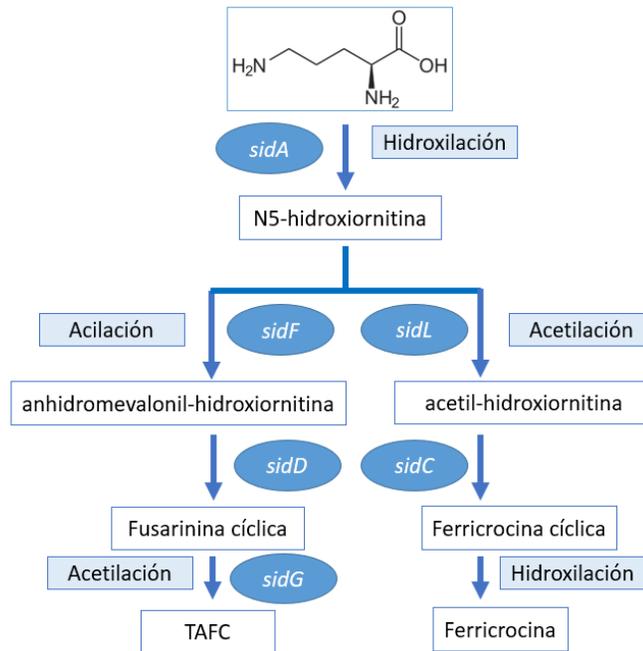


**Figura 1.** Subclases de sideróforos fúngicos de tipo hidroxamatos. Los enlaces peptídicos y de tipo éster que separan los grupos N5-acil-N5-hidroxiornitina están destacados en rojo y azul, respectivamente. Modificado de (Haas et al., 2008.)

### Biosíntesis de sideróforos fúngicos de tipo hidroxamato

La biosíntesis de sideróforos fúngicos ha sido particularmente estudiada y caracterizada en *Aspergillus*, por lo que el mecanismo descrito se basa en lo observado principalmente en este género (Haas, 2014). De igual forma, también se han reportado estudios sobre sideróforos pertenecientes a otros géneros fúngicos levaduriformes tales como: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, entre otros (Bhardwaj et al., 2021). En la Figura 2, podemos

visualizar un esquema representativo de la síntesis de sideróforos en *Aspergillus fumigatus*.



**Figura 2.** Ruta de biosíntesis de sideróforos en *A. fumigatus* (Haas, 2014).

El proceso de síntesis de sideróforos de tipo hidroxamato se inicia con la N5-hidroxilación de la ornitina, la cual es catalizada por una ornitina N5-monooxigenasa. El primer gen fúngico identificado, cuyo producto génico tiene esta actividad enzimática, fue *sid1* de *Ustilago maydis*, seguido por ortólogos en *A. nidulans* (*sidA*), *A. fumigatus* (*sidA*), entre otros (Ghosh et al., 2020). Todas estas enzimas requieren oxígeno como sustrato, y NADPH y FAD como cofactores (Haas, 2014).

El segundo paso es la N5-acilación de la N5-hidroxiornitina. Los grupos acil agregados dependen del tipo de sideróforo; pudiendo ser el grupo acetil más simple, en el caso del ácido rodotorúlico o el ferricromo, u otros más complejos como metilglutaconil o

anhidromevalonil, en el caso del ferricromo A o la fusarinina C, respectivamente (Garnerin & Sonnet, 2017).

Posteriormente, la ruta de biosíntesis difiere en función de si el sideróforo es extra o intracelular. Para los sideróforos extracelulares tipo fusarinina, la transacilasa SidF, une anhidromevalonil a la N5-hidroxiornitina. Este grupo anhidromevalonil se obtiene mediante la acción de SidI y SidH, quienes ligan con CoA y deshidratan el mevalonato, respectivamente. SidI pertenece a una familia de sintetasas acil-CoA cuyos miembros normalmente se encuentran involucrados en el metabolismo lipídico. Por su parte, SidH pertenece a una familia de enoil-CoA hidratadas, que también se encuentra principalmente en el metabolismo de lípidos. Por otro lado, los sideróforos intracelulares, tipo ferricromos, requieren dos transacetilasas: SidL y otra no muy caracterizada cuya expresión se ve aumentada bajo condiciones deficientes de hierro (Haas, 2014). Particularmente, SidL es una N5-hidroxiornitina-acetilasa necesaria para la biosíntesis de ferricrocina (Blatzer et al., 2011). En el tercer paso de síntesis, las unidades de hidroxamato son unidas covalentemente entre sí mediante enlaces de tipo éster (fusarininas y coprogenos) o enlaces peptídicos (ferricromos y coprogenos), siendo esto realizado por sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs) (Haas, 2014).

Las NRPSs son enzimas modulares de gran tamaño y de carácter multifuncional. Estas enzimas ensamblan sustratos acilados en diversos metabolitos secundarios bioactivos y pueden usar cerca de 500 sustratos monoméricos acilados diferentes, entre los cuáles se encuentran: aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, ácidos grasos, entre otros (Bloudoff & Schmeing, 2017). Esto es de extrema importancia para su gran potencial para originar un amplio rango de MS. Un módulo completo de una

enzima NRPS alberga: un dominio de adenilación (A) para la activación y especificidad de sustrato, un dominio portador de grupos peptidil (P) para la unión del sustrato activado mediante un enlace tioéster y un dominio de condensación (C), para la formación del enlace peptídico. Las NRPSs lineales contienen un módulo para cada sustrato a ser incorporado al péptido en formación. En contraste, las NRPSs iterativas tienen uno o más módulos que son usados repetitivamente. Las NRPSs fúngicas sideróforas son de la segunda clase (Hai et al., 2020), lo que dificulta enormemente la predicción de los compuestos finales.

En el modelo estudiado, *Aspergillus fumigatus*, se han caracterizado dos NRPS sideróforas; SidD y SidC (Figura 2). La primera, SidD, une tres residuos N5-cis-anhidromevalonil-N5-hidroxiornitina mediante enlaces de tipo éster. Por otro lado, SidC une tres N5-acetil-hidroxiornitina, dos glicinas y una serina mediante enlaces peptídicos. En otras especies fúngicas, homólogos de SidC han sido confirmados como esenciales para la síntesis de ferricrocina y otros sideróforos de tipo ferricromo, tales como ferricromo C y ferricromo A, entre otros. De forma similar, se han encontrado ortólogos de *sidD* en otros hongos, los cuales serían responsables de la síntesis de sideróforos de tipo fusarininas y coprogenos (Haas, 2014).

La realización de análisis filogenéticos reveló, al menos dos linajes de genes responsables por la síntesis de sideróforos intracelulares en hongos (Hai et al., 2020). El primero es el de Nps2 el cual es representado por *Cochliobolus heterostrophus* Nps2 (AY884187), *Fusarium graminearum* Nps2 (FG05372.3), entre otros. El otro linaje es el de sidC/Nps1 y está representado por *F. graminearum* Nps1 (FG11026), *A. nidulans* SidC (AN0607) y *Ustilago maydis* SidFA/Fer3 (UM01434). Las NRPSs de

ferricromos muestran una arquitectura de dominios consistente en dos a cuatro módulos completos A-P-C, usualmente seguidos por un repetido P-C.

En el caso de los sideróforos extracelulares, también hay evidencia de dos linajes. Un linaje incluye a *C. heterostrophus* Nps6, y sus ortólogos en *N. crassa* y *M. grisea*, mientras que el otro linaje incluye *F. graminearum* Nps6, y sus ortólogos SidD en *Aspergillus* y *Botrytis*. Hay que notar que el primer grupo es conocido por formar coprogenos y derivados, mientras que el último produce sideróforos de tipo fusarininas. Se ha observado que, tanto en SidD como en Nps6, el módulo alberga dominios A degenerados que están truncados en su extremo N-terminal por cerca de 290 residuos aminoacídicos. Estos dominios se creen inactivos, correspondiendo a elementos vestigiales, los que en la actualidad cumplen roles estructurales en la conformación de las NRPSs (Haas, 2014; Hai et al., 2020).

### **Transporte de sideróforos fúngicos**

La entrada de los complejos sideróforo-hierro es mediada principalmente por transportadores de sideróforo-hierro (SITs), pertenecientes a una subfamilia de la superfamilia más grande de facilitadores proteicos. Los SITs actúan como cotransportadores de protones energizados por el potencial de la membrana plasmática. El transporte de hierro mediado por SITs está confinado y es altamente conservado en los organismos fúngicos, incluso en especies que no son capaces de producir sus propios sideróforos como *S. cerevisiae* y *Candida* spp. (Haas, 2008; Haas et al., 2014).

La gran mayoría de especies fúngicas presentan múltiples transportadores SIT, por ejemplo, *A. nidulans* presenta 10 SITs codificados en su genoma. La unión con el

transportador no es dependiente del tamaño o de la hidrofobicidad del sideróforo, pero su interacción depende de la presencia de sitios específicos de unión.

### **Organización y regulación de clusters génicos de sideróforos fúngicos**

Particularmente en *Aspergillus*, se ha observado que los genes implicados en el metabolismo de sideróforos se encuentran organizados en tres clústers génicos, facilitando la co-regulación de su expresión. Los genes *sidA*, *sidL* y algunos potenciales genes de transportadores de sideróforos suponen una excepción y se encuentran ubicados en otros lugares dentro del genoma. En otras especies fúngicas, tales como *U. maydis* y *S. pombe* (Schrettl et al., 2008) se han encontrado todos los genes de biosíntesis de sideróforos agrupados en clústers.

Los dos factores transcripcionales implicados en la regulación del hierro son SreA y HapX. En suficiencia de hierro, el factor GATA SreA, reprime los sistemas de gran afinidad para la captación de hierro, incluyendo el sistema de sideróforos, para evitar la toxicidad de este elemento. En cambio, el factor de transcripción bZIP, HapX, reprime las vías de consumo de hierro como la respiración, la biosíntesis de grupos heme y activa el sistema de sideróforos (Haas, 2014; Schrettl et al., 2008, 2010).

### **Sideróforos de organismos fúngicos que habitan ambientes extremos**

Los organismos de ambientes extremos tienen requerimientos particulares de hierro dependiendo de las condiciones ambientales del hábitat en el que crecen (De Serrano et al., 2016). La mayoría de los trabajos realizados y publicados sobre producción de sideróforos por extremófilos, se han desarrollado considerando principalmente organismos bacterianos, focalizándose en la determinación de la concentración de potenciales compuestos sideróforos e, incluso, algunos llegando a realizar estudios

genómicos para determinar la presencia de genes asociados a la biosíntesis o el transporte de este tipo de compuestos (De Serrano et al., 2016).

Dentro de las diversas condiciones ambientales extremas para un organismo, los ambientes de frío extremo, como el que se encuentra en la Antártica, presentan importantes condiciones limitantes para la sobrevivencia, tales como: frecuentes ciclos de congelamiento, niveles altos de concentración de sal, baja disponibilidad de agua, extrema radiación de tipo UV y baja disponibilidad de nutrientes. Para sobreponerse a las condiciones extremas, los organismos desarrollan diversos mecanismos de tolerancia, que resultan en proteínas o metabolitos de muchísimo interés biotecnológico (Odoh et al., 2021).

A diferencia de los diversos estudios metabólicos y enzimáticos de caracterización de sideróforos en bacterias, en los hongos sólo se ha evidenciado su producción en levaduras antárticas (Connell et al, 2014), pero no se han reportado estudios sobre la producción de sideróforos en hongos filamentosos antárticos.

#### **Producción de sideróforos en el género fúngico *Pseudogymnoascus***

El género fúngico *Pseudogymnoascus* se caracteriza por habitar ambientes fríos (Hayes, 2012), siendo especialmente prevalente en el continente Antártico (de Menezes et al., 2019). El conocimiento del metabolismo secundario del género *Pseudogymnoascus* está muy poco estudiado, siendo los primeros metabolitos aislados del género los pertenecientes a una cepa antártica (Figuroa et al., 2015).

El interés científico por el género fúngico de *Pseudogymnoascus* se ha enfocado principalmente en el patógeno *P. destructans*, siendo en esta especie la única en la que se han realizado estudios relacionados con sideróforos. Respecto a este tipo de MSs, ha sido reportado que en el proceso infeccioso de murciélagos, *P. destructans*

secreta 2 tipos de sideróforos; TAFC y ferricromo (Mascuch et al., 2015). Sin embargo, se desconocen las enzimas específicas que estarían implicadas específicamente en la síntesis de estos sideróforos, contándose únicamente con registros de análisis bioinformáticos predictores. Adicionalmente, ningún estudio en sideróforos de organismos fúngicos antárticos ha sido reportado hasta la fecha. Nuestro grupo de trabajo, Laboratorio de Química Microbiológica de la Facultad de Ciencias, se ha enfocado en el estudio del potencial metabólico de una cepa fúngica denominada *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, la cual fue aislada de una esponja colectada en Bahía Fildes, Isla Rey Jorge, Antártica (Henríquez et al., 2014). Los extractos de los caldos de cultivo de esta cepa mostraron una interesante actividad antitumoral y antimicrobiana. Además, el perfil metabólico de <sup>1</sup>H-RMN presentó una gran variedad de grupos funcionales, lo que indicaba la presencia de MSs de variadas estructuras. Buscando caracterizar las vías de biosíntesis de los MSs producidos por este organismo, en trabajos previos (Vega, 2018; Oliva, 2019) y considerando los genomas de cuatro especies del género *Pseudogymnoascus*: *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4281 (FW-2241), *Pseudogymnoascus* sp. VKM F-4513 (FW-928), *Pseudogymnoascus pannorum* y *Pseudogymnoascus verrucosus*, se diseñaron primarios para identificar las NRPSs presentes en el ADN genómico. Así, se logró amplificar un fragmento de 528 nucleótidos cuya secuencia fue evaluada mediante Blastx contra la base de datos de genomas fúngicos. De este análisis se obtuvo que este fragmento, al cual se denominó *gymE*, poseía un 63% de identidad con una NRPS productora de sideróforos de *Aspergillus flavus*. Este resultado, sugiere la posibilidad que *gymE* codifique a una NRPS siderófora. Considerando lo expuesto, y que recientemente se logró secuenciar y anotar el genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, se establecen los siguientes objetivos para este trabajo.

**Objetivo General:**

Identificar en el hongo antártico *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB genes codificantes para sintetasas de péptidos no ribosomales potencialmente productoras de sideróforos y caracterizar sus productos.

**Objetivos Específicos:**

1.- Identificar y analizar bioinformáticamente las NRPS con potencial sideróforo presentes en el genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB.

2.- Purificar y caracterizar los sideróforos producidos por alguna de las NRPS sideróforas del hongo antártico *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB.

**MATERIALES Y MÉTODOS****1 Análisis bioinformático**

Los avances en el entendimiento sobre la genética y enzimología de la biosíntesis de productos naturales han facilitado la identificación y análisis de clústers génicos de MSs, permitiendo el desarrollo de un nuevo enfoque para el estudio de los MS conocido como “genome mining”. Este se basa en el uso de recursos bioinformáticos, genómicos y bioquímicos para la detección de la ruta biosintética de productos naturales con potencial biotecnológico y de sus posibles interacciones químicas y funcionales. El gran número de genomas fúngicos disponibles en bases de datos de libre acceso y el desarrollo de algoritmos bioinformáticos como SMURF (Khaldi et al. 2010) y antiSMASH (Medema et al. 2011), han permitido identificar clusters génicos de compuestos potencialmente nuevos, analizar las secuencias de los productos génicos de estos clústers y caracterizar preliminarmente los productos naturales sintetizados por estos (Albarano et al., 2020).

El análisis de identidad de secuencias se efectuó utilizando las herramientas disponibles en la base de datos NCBI (National Center of Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La búsqueda de los clusters de NRPS se realizó aplicando la herramienta antiSMASH (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>; Medema & cols., 2011) al genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB (No publicado). Una vez identificados los cluster con NRPSs sideróforas como posibles enzimas principales, se utilizó AUGUSTUS (<https://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) para identificar los ORFs presentes en esa región de interés. Después, mediante la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se evaluó la posible función de dichos ORFs. Finalmente, se utilizó la información de las secuencias génicas implicadas en metabolismo de sideróforos en dos organismos de interés: *Pseudogymnoascus destructans* 20631-21 (GenBank LAJJ00000000.1) (Mascuch et al., 2015), un organismo perteneciente al mismo género que nuestro organismo de estudio y *A. fumigatus* (Le Govic et al., 2018), un organismo fúngico ampliamente estudiado en términos de su metabolismo de sideróforos, debido a su carácter patógeno. Usando como guías dichas secuencias de interés, se usó la herramienta BLASTX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para buscar otros genes del metabolismo de sideróforos posiblemente presentes en nuestro organismo de estudio en regiones diferentes a los clusters encontrados.

## **2 Material biológico**

### **2.1 Cepa fúngica**

La investigación se realizó con la cepa fúngica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, la cual se encuentra conservada en glicerol a -80°C. El crecimiento se efectuó utilizando placas Petri con medio PDA (Difco) a 15 °C por dos semanas.

## 2.2 Material de trabajo

Para eliminar cualquier traza de hierro del material de vidrio utilizado (matraces, probetas, tubos de ensayo y vasos precipitados), se efectuaron lavados con ácido clorhídrico técnico 6M y agua destilada. Esto se realizó tres veces con todo el material utilizado y se repitió en cada experimento realizado.

## 3 Fermentaciones

### 3.1 Medios de cultivo

Czapeck: sacarosa 30 g/L,  $K_2HPO_4$  0,5 g/L, solución concentrada de sales Czapek 10 mL/L.

Czapeck sin Fe: sacarosa 30 g/L,  $K_2HPO_4$  0,5 g/L, solución concentrada de sales Czapek 10 mL/L (sin la adición de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , presente en la fórmula de las sales Czapek).

M9 suplementado con Mg/Ca/B1/Goodie Mix y 4 g/L sacarosa (Bosello et al., 2013; Vala et al., 2000):

Solución 1 (Medio M9):  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  12.8 g/L,  $KH_2PO_4$  3.0 g/L, NaCl 0,5 g/L,  $NH_4Cl$  1.0 g/L suplementado con solución acuosa de sacarosa al 40 %.

Solución 2 (Solución de elementos traza):  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  49,0 g/L,  $CaCO_3$  2,0 g/L,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  1,44 g/L,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0,85 g/L,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0,24 g/L,  $HBO_3$  0,06 g/L y 51,3 mL de HCl 37% por litro de solución. Esterilización mediante autoclave.

Solución 3 (Concentrated Goodies): 50 % v/v Solución 2 y 6,15 % m/v  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .

Solución 4 (Mg/Ca/B1/Goodie Mix): 250 mL solución 3, 0,2 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1,1g/L CaCl<sub>2</sub>, 0,034 g/L Tiamina (Vitamina B1). Esterilización mediante filtración.

Solución 5: Solución acuosa de sacarosa al 40%.

Proporción final para 1 L: 980 mL de solución 1, 10 mL de solución 3 y 10 mL de solución 4.

PDA (Medio de papa y dextrosa agar): 39 g por litro de agua de medio PDA (Difco), agar técnico 0,5%.

### **3.2 Fermentaciones de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en distintos medios**

En primer lugar, se preparó una solución de esporas, raspando una placa de PDA de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. de 2 semanas de crecimiento a 15°C con una solución estéril de NaCl 0.9% y filtrándola a través de un embudo con MIRACLOTH. Posteriormente, se inocularon 3 matraces de 250 mL que contenían 50 mL de Czapeck líquido con y sin hierro y medio M9, respectivamente, con 1 mL de la solución de esporas a una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/mL. Tras una incubación a 15°C y 180 rpm por 3 días, 5 mL de estos pre-inóculos se utilizaron para inocular tres matraces de 250 mL con 50 mL de cada uno de los tres medios de fermentación. Las fermentaciones se realizaron por 9 días a 15° C y 180 rpm, y cada día se colectaron 1mL de caldo de cultivo en tubos Eppendorf, los que fueron filtrados y guardados a 4°C.

### **3.3 Fermentaciones de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en medio M9 con y sin Fe<sup>+3</sup>**

Utilizando la solución de esporas obtenida como se indica en el punto 3.2, se inocularon 2 matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio M9, en su formulación habitual y con 25 mM de FeCl<sub>3</sub>, respectivamente. Tras una incubación a 15°C y 180 rpm por 5 y 8 días, el micelio de cada matraz se filtró con NYTAL®, se lavó con 500 mL de una solución estéril de NaCl 0.9%, y se secó con papel filtro estéril para finalmente almacenarlo a -80°C. Así también, se colectó y guardó el caldo de cultivo de cada matraz en un tubo falcon de 50 mL.

### **4. Ensayo CAS**

Las reacciones para cada ensayo se prepararon mezclando 150 µL de la solución CAS con 150 µL del caldo de cultivo a evaluar (Retamal-Morales et al., 2018). Posteriormente, se incubaron a temperatura ambiente durante 4 horas y luego se procedió a medir la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 630 nm. Además, para cada ensayo se efectuó un control negativo de coloración, el cual se realizó con 150 µL solución CAS y 150 µL agua y un control de decoloración completa, efectuado con 150 µL CAS solution, 10 µL EDTA 0.5M y 140 µL de agua. Teniendo los valores de absorción de estos controles y de las muestras, se calculó el porcentaje de decoloración, utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{(\text{CN-Muestra})}{(\text{CN-CD})} * 100$$

Siendo CN y CD los valores de absorbancia a 630 nm del control negativo y del control de decoloración completa, respectivamente.

## **5. Ensayo del cloruro férrico**

El ensayo del cloruro férrico se basa en que casi todos los complejos de hierro presentan coloración. Debido a esto, la adición de cloruro férrico o perclorato férrico al caldo de cultivo, permite detectar la presencia de compuestos sideróforos y la potencial clase de estos, ya que ha sido reportado que los trihidroxamatos suelen tener una coloración anaranjada con un máximo de absorbancia entre 425-450 nm, mientras que los triccatecolatos presentan habitualmente un color morado y un máximo de absorbancia a 495 nm (Neilands, 1981). Las reacciones para este ensayo se prepararon mezclando en un tubo de ensayo 1 mL del caldo de cultivo a evaluar, el cual se mantuvo previamente a 4°C durante 24 horas. Luego, se añadió 2 mL de una solución acuosa al 2% de FeCl<sub>3</sub>. Tras una incubación de 30 min a temperatura ambiente (Vala et al., 2006) se observó la presencia de precipitados. Por ello, se procedió a tomar 1.5 ml de la mezcla y se centrifugó en un tubo eppendorf de 2 mL por 5 min a 10000 rpm. Finalmente, el sobrenadante se recolectó y se evaluó el cambio de coloración de forma cualitativa (mediante observación) respecto a un control realizado con medio de cultivo tratado de la misma forma.

## **6. Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina (CCF) supone una técnica sencilla y efectiva para realizar el análisis preliminar del número de compuestos sideróforos en una muestra e identificar la clase a la que pertenecen. Dependiendo de la clase de sideróforo, hay distintas mezclas de solventes para eluir las placas que permiten una mejor resolución. Particularmente, la utilización de 2-propanol/metanol/agua/ácido acético (8/1/0,5/0,5, v/v/v/v) favorece la separación de hidroxamatos, mientras que una mezcla de butanol/ácido acético/agua (12:3:5, v/v) favorece la separación de sideróforos de tipo

catecolatos (Hayen & Volmer, 2005; Xie et al., 2006). Para el análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) se utilizaron cromatofolios de silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck). 30 mL del caldo de cultivo a analizar procedente de una fermentación en medio M9 sin hierro de 8 días, se concentró hasta un volumen de 600 µL. Para cada análisis, se utilizó 50 µL del caldo concentrado, el cual se dispuso en el punto de aplicación del TLC. Por otro lado, cada caldo se ensayó por duplicado empleando dos mezclas de elución distintas: butanol/ácido acético/agua (12:3:5) y 2-propanol/metanol/agua/ácido acético (8:1:0,5:0,5) (Hayen & Volmer, 2005; Kavitha et al., 2017). Tras la elución, las placas se secaron y se les aplicó un spray con una solución al 1% de FeCl<sub>3</sub> en etanol, para visualizar los compuestos sideróforos (Storey & Chakraborty, 2005).

## **7. Extracción de ARN desde micelio**

El micelio se colectó mediante filtración del cultivo con filtros Nyltal estériles, lavado con 500 mL de una solución estéril de NaCl 0.9%, secado con papel filtro estéril y almacenado a -80°C. Después, el micelio congelado se molió en un mortero con nitrógeno líquido, y del polvo resultante, se colectan 50 mg en un tubo eppendorf de 2 mL. A este micelio molido se le adiciona 1 mL del reactivo TRIsure™ (Bioline), y la mezcla es homogeneizada por vortéx. Para aumentar el nivel de ruptura celular, se sumergió un disruptor celular (Tissuruptor®), dando tres pulsos de 30 s cada uno. Esta primera etapa finalizó con una incubación a 65°C por 5 min y a temperatura ambiente, por el mismo período de tiempo. Luego, se centrifugó durante 15 min, a 14000 rpm y 4°C, y se colectó cada fase acuosa en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL. A continuación, se añadió un volumen de 200 µL de cloroformo, se homogeneizó por inversión, tras lo cual cada tubo se incubó a temperatura ambiente por 3 min.

Pasado este tiempo, se centrifugó en las mismas condiciones indicadas previamente y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL, tras lo cual se efectuó un nuevo lavado con 200  $\mu$ L de cloroformo. La nueva fase acuosa colectada, se mezcló con 500  $\mu$ L de isopropanol por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posterior a esto, se centrifugó a 14000 rpm y 4°C, se descartó el sobrenadante, se lavó el precipitado con 500  $\mu$ L de etanol 70% frío (en agua con DEPC), y se volvió a centrifugar a 4°C y 14000 rpm por 5 min. Finalmente, tras descartar el sobrenadante, el precipitado se secó por 45 min a temperatura ambiente. El ARN obtenido se resuspendió en 60  $\mu$ L de agua con DEPC, se cuantificó por espectrofotometría y su integridad se verificó mediante visualización por gel de agarosa. El potencial ADN residual presente en el ARN extraído se trató con la enzima DNase I (RNase-free) (NEB) por 10 min a 37°C. La posterior inactivación de esta enzima se realizó añadiendo 10  $\mu$ L de EDTA 50 mM e incubando por 10 min a 75°C.

### **7.1 Generación de ADN complementario (ADNc)**

La obtención del ADNc se realizó utilizando el kit 5X ALL-IN-ONE RT MÁSTER MIX (AB). La reacción se efectuó tomando 5,5  $\mu$ L del ARN tratado con DNasa, 2  $\mu$ L del mix de RT-PCR y 2,5  $\mu$ L de agua tratada con DEPC en un tubo de PCR. La mezcla se homogeneizó por inversión e incubó a 25°C por 10 min. La síntesis de ADNc se efectuó en un termociclador configurado para hacer un ciclo de 50 min a 42°C. La reacción se detuvo sometiendo el tubo 5 min a 85°C por 5 min. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **7.2 PCR**

Para la amplificación por PCR y la visualización de la presencia de transcritos de los genes de interés, se efectuaron reacciones de PCR con GoTaq® Green Máster Mix en

un volumen total de 20  $\mu$ L. La mezcla de cada reacción contenía 10  $\mu$ L de GoTaq® Green Máster Mix (2x), 0,8  $\mu$ L (10  $\mu$ M) de cada partidor, 7,6  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y 0,8  $\mu$ L de ADNc. El programa utilizado fue: Denaturación inicial de 3 min a 95°C, 33 ciclos de denaturación a 95°C por 40 s, hibridación de los partidores a 55°C por 40 s, elongación a 72°C por 50 s y, por último, elongación final a 72°C por 10 min. Finalmente, el producto de cada reacción se visualizó en gel de agarosa al 1% en un transiluminador UV. La cuantificación se realizó por espectrofotometría. Los partidores utilizados en este Seminario de Título se adjuntan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Partidores utilizados para la reacción de PCR del gen *gymE* y el gen de la betatubulina.**

Número	Nombre	Secuencia	Tamaño amplificado
1	BtubA	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTT C	300 pb
2	BtubB	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGG C	
3	GymE-Rv	TAACGCCCATTTCTTGAAGC	429 pb
4	GymE-Fw	TCACTGTCCAAAACCTCCGA	

En la Tabla se indica junto al nombre de cada partidor, su secuencia nucleotídica y el tamaño del fragmento amplificado con cada par. Lo partidores BtubA y BtubB corresponden al control del gen de la betatubulina, y los partidores GymE-Rv y GymE-Fw al gen que codifica para la NRPS de interés (GymE).

## **8. Análisis químico de los caldos de las fermentaciones de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB**

### **8.1 Preparación de muestras desde los caldos de cultivo para análisis por HPLC**

Para cada caldo de cultivo a analizar, se colectó 1 mL de caldo en un tubo Falcon de 15 mL, y se le adicionó 4 mL de metanol grado HPLC. Tras incubarlo a 4°C por 24 h, se centrifugó a 9000 rpm por 20 min, se colectó el sobrenadante y se agregó una solución acuosa 1% FeCl<sub>3</sub> para quelar los posibles sideróforos presentes en el extracto y hacerlos más estables (se utilizaron dos cantidades diferentes, ver Tabla 2). Luego,

se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Tras separar el sobrenadante por decantación, éste se filtró utilizando un filtro de 0.45 µm y se procedió a concentrar mediante rotavapor. Una vez seco, se disolvió en 200 µL de metanol grado HPLC y se centrifugó a 14000 por 3 min para eliminar el precipitado formado. Un volumen de 10 µL de este sobrenadante se inyectó para su análisis en el equipo de HPLC. Este ensayo se realizó en caldos colectados a dos tiempos de cultivo (5 y 8 días), y adicionando dos cantidades distintas de solución férrica ( 2 mL o 5 mL). La última variable ensayada fue realizar una prepurificación del caldo tratado con solución férrica con amberlita o no hacerla. Todos estos ensayos (resumidos en la Tabla 2) sirvieron para determinar las mejores condiciones en las se podían producir y detectar los sideróforos.

**Tabla 2.** Parámetros de cultivo y tratamiento químico evaluados para optimizar la presencia de compuestos sideróforos en las muestras analizadas por HPLC.

<b>Parámetro</b>	<b>Condiciones ensayadas</b>
<b>Tiempo de cultivo</b>	5 días
	8 días
<b>Volumen de solución acuosa 1% de FeCl<sub>3</sub> adicionado a la muestra</b>	5 mL
	2 mL
<b>Pre-tratamiento con Amberlita XAD-16</b>	Realizado
	No Realizado

## **8.2 Análisis de muestras mediante HPLC analítico**

El equipo de HPLC utilizado está constituido por un detector de fotodiodo (Waters 2998), un conjunto binario de bombas (Waters 1525), un horno de columna (Waters

1500) y un desgasificador (Waters on-line degasser AF). Para los análisis realizados se usó una columna C-18 de fase reversa (Sunfire C18, Waters, 4,6 x 250 mm, 5 µm) estabilizada a 35°C. El programa utilizado para el tratamiento de datos fue el EMPOWER 3. El protocolo de elución se detalla en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Protocolo de elución por HPLC analítico para determinación de sideróforos

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A <sup>(a)</sup>	%B <sup>(a)</sup>	Curva
	1.00	95.0	5.0	
<b>15.00</b>	1.00	40.0	60.0	6
<b>20.00</b>	1.00	0.0	100.0	6
<b>23.00</b>	1.00	0.0	100.0	6
<b>25.00</b>	1.00	95.0	5.0	6

(a) Solvente A: agua con 0.1% de TFA; Solvente B: acetonitrilo con 0.02% de TFA

### 8.3 Purificación de potenciales compuestos sideróforos

Para la producción de compuestos sideróforos se hicieron fermentaciones de la cepa en medio M9 con sacarosa por 8 días a 15 °C y 200 rpm. Una vez cumplido este tiempo de cultivo, se recolectó el caldo mediante filtración con Nyltal y se le agregó metanol en una proporción 1:4 (v/v). Después se incubó la mezcla a 4°C por 24 h para precipitar las proteínas presentes en el caldo. Trascurrido este tiempo, se procedió a centrifugar a 9000 rpm por 20 min la mezcla, coleccionar el sobrenadante y concentrarlo en un rotavapor a presión reducida. Posteriormente, a 2 g de este extracto seco de caldo de cultivo, se le adicionaron 250 mL de una solución acuosa de FeCl<sub>3</sub> al 1%, con

la finalidad de disolver y quelar todos los sideróforos presentes. A continuación, se centrifugó la mezcla a 9000 rpm por 20 min, para descartar el precipitado formado. Después, se cargó todo el sobrenadante en una columna de vidrio de 6.5 cm de diámetro con resina XAD16 (675 cm<sup>3</sup>) previamente activada con metanol y ambientada en agua. Tras pasar 1,5 L de agua a través de la columna, para la eliminación de los compuestos polares que no se retienen en la columna, los compuestos retenidos se eluyeron con 1L de metanol. El eluido metanólico fue concentrado en rotavapor, obteniendo un extracto de 0,2073 g. Se analizó, mediante HPLC analítico, la presencia de los posibles sideróforos en la fracción metanólica y también en la fracción del lavado de la columna de Amberlita XAD-16, confirmando la presencia de los compuestos correspondientes a sideróforos en la fracción metanólica. Posteriormente, se aislaron los posibles sideróforos presentes en la fracción metanólica mediante HPLC, esta vez equipado con una columna C18 semipreparativa (Sunfire C18, Waters, 10 x 250 mm, 5 µm). Los 200 mg de extracto se inyectaron en fracciones de 20 mg. La elución se realizó utilizando los mismos solventes y condiciones que las descritas en la Tabla 3, pero utilizando un flujo de 4,5 mL/min. Tras coleccionar las fracciones de interés, para evitar la hidrólisis ácida de los sideróforos, cada una de las fracciones fueron llevadas a pH 5,5, utilizando una solución NaOH 5 M y se concentraron en un rotavapor a presión reducida hasta sequedad.

#### **8.4 Análisis de espectrometría de baja y alta resolución y resonancia magnética nuclear**

Los experimentos de LRESIMS y HRESIMS de las muestras purificadas fueron realizados en un equipo QSTAR Elite (Applied Biosystems) en el Centro de Investigaciones científicas Avanzadas (CICA) de A Coruña, España. Adicionalmente,

con el fin de poder realizar experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN de los posibles nuevos sideróforos, fue necesario eliminar el hierro de las muestras. Para ello, cada fracción fue tratada con resina Chelex-100 (Sigma- Aldrich, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

## RESULTADOS

### **1 Análisis bioinformático y búsqueda de genes codificantes para enzimas NRPS y genes implicados en la síntesis de sideróforos en la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB**

Como ya se mencionó en los antecedentes, en trabajos previos del laboratorio se amplificó y secuenció un fragmento de 528 nucleótidos desde el ADN genómico de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, el cual poseía un 63% de identidad con una NRPS productora de sideróforos de *Aspergillus flavus*. Así, se hipotetizó que este fragmento pertenecía a un gen codificante de una NRPS implicada en la biosíntesis de sideróforos en esta cepa de *Pseudogymnoascus*, la cual fue denominada GymE.

Los clústers génicos de metabolitos secundarios, que contienen NRPSs como enzimas principales son relativamente sencillos de identificar, ya que este tipo de enzimas presentan una organización multimodular muy característica (Süssmuth & Mainz, 2017). Debido a esto, una vez que se obtuvo el genoma de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, se utilizó la herramienta antiSMASH (Medema et al., 2011) para evaluar la presencia de otros clusters génicos con genes codificantes de NRPSs sideróforas como enzima principal, en donde la especificidad conferida a las NRPSs por su dominio de adenilación es clave

La herramienta bioinformática antiSMASH predice marcos de lectura abiertos, para luego buscar las secuencias aminoacídicas traducidas de todos los genes codificantes para proteínas, utilizando un perfil de modelos ocultos de Márkov (pHMMs). Esto último, basado en alineamientos múltiples de secuencias de proteínas claves o de dominios característicos de clústers génicos biosintéticos de interés (Medema et al., 2011).

Para el análisis de los posibles clusters se emplearon dos estrategias de identificación y análisis, con el fin de que esta búsqueda fuera lo más completa posible. La primera, se basó en el uso de la herramienta antiSMASH, y los accesos que nos proporciona a otras bases de datos. La segunda estrategia se basó en el alineamiento de los genes de las rutas de biosíntesis fúngica de sideróforos de un modelo más estudiado, *A. fumigatus*, con el genoma de *Pseudogymnoascus sp.* 131209-E2A-C5II-EB. Además, en forma paralela, se realizó el alineamiento con los genes relacionados con sideróforos detectados en el genoma anotado más completo del género *Pseudogymnoascus*, el genoma de *P. destructans*.

Aplicando la primera estrategia, se identificaron 8 potenciales clústers con NRPSs como enzimas principales en el genoma de *Pseudogymnoascus sp.* 131209-E2A-C5II-EB, los que se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** NRPSs identificadas en el genoma de *Pseudogymnoascus sp.* 131209-E2A-C5II-EB mediante antiSMASH

NRPS	Tamaño gen (pb)	Contig	Cluster antiSMASH	Dominios NRPS
GymA	14133	1	3.2	P-A-C-P-C-C
GymE	6354	6	28.2	A-P-C-P-C
GymH	3954	1	3.3	C-A-NAD

<b>GymM</b>	5862	1	3.1	P-C-A-P-C
<b>GymO</b>	3519	34	42.1	A-P-NAD
<b>GymP</b>	3966	53.1	53.1	A-P-TD-KR
<b>GymQ</b>	9303	72.1	72.1	C-A-P-C-A
<b>GymW</b>	1131	32.1	32.1	No identificados

Nota: El dominio TD corresponde al dominio reductasa terminal (Medema et al., 2011), KR a un dominio cetoreductasa (Letunic et al., 2021) y NAD reductasa como proteína de esterilidad masculina (Aarts et al., 1997)

Posteriormente, se analizaron las secuencias codificantes de estas ocho NRPSs, encontrándose que dos de ellas eran identificadas como NRPSs sideróforas. La primera de ellas correspondía a la secuencia completa de la enzima GymE, previamente detectada experimentalmente como se indicó en los antecedentes, mientras que la otra enzima fue denominada GymA.

Interesantemente, el alineamiento de la secuencia del transcrito asociado a GymA mediante la herramienta BLASTx (Tabla 5) arrojó como primer resultado, un 89,40% de identidad con la secuencia nucleotídica de una NRPS de *Pseudogymnoascus verrucosus*, de función desconocida.

**Tabla 5.** Resultados del análisis por BLASTx de las secuencias nucleotídicas de GymA y GymE.

NRPS	Tamaño gen (pb)	Conting	Clúster antiS MASH	Dominios NRPS	% Identidad	Resultado BLASTx	Código acceso GenBank
<b>GymA</b>	14133	1	3.2	P-A-C-P-C-C	89.40%	NRPS [ <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> ]	XP_018134191.1
					43.32%	Sintetasa de sideróforos hidroxamatos Ferricromo [ <i>Lachnellula</i>	TVY93406.1

						<i>willkommii</i> ]	
<b>GymE</b>	6354	6	28.2	A-P-C-P-C	99.52%	NRPS [ <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 24MN13]	OBT5845 0.1
					92,47%	NPS6 NRPS [ <i>Pseudogymnoascus destructans</i> ]	XP_0243 23042.1

Para poder dirigir un poco más la búsqueda, se buscó el primer resultado de BLASTx en donde se observa un resultado con un gen de función conocida. Esto permitió evidenciar que *gymA* tiene un 43,07% de identidad con la secuencia nucleotídica de una NRPS de hidroxamatos tipo Ferricromo de *Lachnellula willkommii*, es decir, una NRPS implicada en la biosíntesis de sideróforos intracelulares.

En el caso de GymE (Tabla 5), los dominios característicos de la potencial NRPS detectados presentaban la siguiente combinación: A-P-C-P-C. Por otro lado, el alineamiento de la secuencia del transcrito asociado a GymE mediante BLASTx (Tabla 5) mostró un 99.52% de identidad con la secuencia nucleotídica de una NRPS de *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13, de función desconocida y un 92,47% de identidad con una NRPS de tipo NPS6 de *P. destructans*. Esto último, nos permitió hipotetizar sobre la posible función de GymE en la biosíntesis de sideróforos extracelulares.

Luego, contemplando la información obtenida con la primera estrategia, se evaluaron los potenciales genes ubicados en el entorno génico, pudiendo formar parte del cluster génico identificado por antiSMASH para GymA. Los resultados se pueden visualizar en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Resultados del análisis por antiSMASH y BLASTx del clúster génico de GymA y los marcos de lecturas abiertos identificados en la región.

NRPS antiSMASH	Contig	Posicion y tamaño en contig	ORF	Código GeneBank resultado BlastX	Porcentaje de identidad de secuencia	Descripción
<b>Cluster génico GymA</b>	1	282,103 - 329,885 nt (tamaño total: 47783)	g1	OBU00294.2	99,70%	Morfoproteína celular PAG1 [Pseudogymnoascus verrucosus]
			g2	OBU00295.2	91,11%	Proteína hipotética VE01_01487 [Pseudogymnoascus verrucosus]
			g3	XP_031002459.1	52,71%	Nucleasa S1 [Lachnellula hyalina]
			g4	PBP21170.1	34,26%	siroheme sintasa [Diplocarpon rosae]
			g5	KAE9371368.1	51,96%	L-ornitina N5-oxigenasa sida [Chalara longipes BDJ]
			g6 (Gym A)	TVY93406.1	43,32%	Sintetasa de sideróforos hidroxamatos Ferricromo [Lachnellula willkommii]
			g7	XP_024321730.1	95,74%	ARN polimerasa regulada por ADN [Pseudogymnoascus destructans]
			g8	XP_024321586.1	93%	Proteína mitocondrial 25 de la síntesis de ATPasa [Pseudogymnoascus destructans]
			g9	PMD35919.1	44,03%	Proteína de reparación de ADN tipo Rad26 [Hyaloscypha variabilis F]
			g10	RDW69250.1	82,34%	Fosfatidato citidiltransferasa [Coleophoma cylindrospora]
			g11	KAG0646309.1	79,95%	Acetil-aciltransferasa B [Hyphodiscus hymeniophilus]

			g12	KAG0652716 .1	74,34%	Transportador de sulfato [Hyphodiscus hymeniophilus]
--	--	--	-----	------------------	--------	---

De acuerdo con los resultados registrados en la Tabla 6, en la región génica delimitada para el cluster 3.2 (Ver Tabla 5), es decir, el que presenta a GymA como posible enzima principal, se encontraron 11 marcos de lectura abiertos. Interesantemente, tras los análisis iniciales por BlastX de las secuencias codificantes de los ORF detectados, g5 presentó un 51,96% de identidad con la secuencia codificante para una L-ornitina N5-oxigenasa (SidA). Esto es de gran importancia, ya que el producto génico de este gen (véase introducción) realiza el primer paso en la ruta de biosíntesis de los sideróforos de tipo hidroxamato. De hecho, la delección de este gen en *A. fumigatus*, genera cepas incapaces de producir estos compuestos (Del Campo et al., 2016). Los otros ORFs detectados presentaron similitud con genes codificantes de proteínas con diversas funciones, tales como: reparación de ADN, biosíntesis de fosfolípidos, morfogénesis y proliferación celular, entre otras.

De forma análoga, se evaluaron los genes potenciales presentes en el cluster de GymE, cuyos resultados se pueden visualizar en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Resultados del análisis por antiSMASH y BLASTx del cluster génico de GymE y los marcos de lecturas abiertos identificados en la región.

NRPS antiSMASH	Contig	Posición y tamaño en contig	ORF	Código GeneBank resultado BlastX	Porcentaje de identidad de secuencia	Descripción
<b>Cluster génico GymE</b>	6	1,031,857 - 1,077,619 nt. (tamaño	g1	OBT58435.1	100%	Proteína hipotética VE04_01717 [Pseudogymnoascus sp. 24MN13]

		total: 45,763 nt)	g2	KAF3403270.1	79,63%	Lactosa permeasa [ <i>Talaromyces pinophilus</i> ]
			g3	KIM96761.1	83,33%	Proteína de la familia 88 de glicosido hidrolasa [ <i>Oidiodendron maius</i> Zn]
			g4	GFG15377.1	61,72%	Estreptotricina hidrolasa [ <i>Aspergillus udagawae</i> ]
			g5	KEY82637.1	73,94%	Factor de transcripción C6 [ <i>Aspergillus fumigatus</i> var. RP-2014]
			g6	OBT58451.1	98,56%	Proteína hipotética VE04_01722 [ <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 24MN13]
			g7	XP_018132469.1	97,03%	Proteína hipotética VE01_03286 [ <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> ]
			g8	RMJ28842.1	72,46%	Lipasa esterasa de biosíntesis de sideróforos [ <i>Aspergillus</i> sp. HF37]
			g9 (GymE)	RAQ54485.1	68,59%	NRPS Sid2 [ <i>Aspergillus flavus</i> ]
			g10	QYT04985.1	76,52%	Transportador de sideróforos [ <i>Trichoderma simmonsii</i> ]
			g11	PYH91753.1	81,99%	ClpP/crotonasa [ <i>Aspergillus ellipticus</i> CBS 707.79]
			g12	XP_002152436.1	75,45%	Acetiltransferasa SidF [ <i>Talaromyces marneffe</i> ATCC 18224]
			g13	XP_031866790.1	78,91%	ABC multidrug transporter SidT

						[ <i>Venustampulla echinocandica</i> ]
			g14	OBT58434.1	94,37%	CMGC/SRPK protein kinase [Pseudogymnoascus sp. 24MN13]
			g15	XP_018132571.1	84,78%	Proteína hipotética V499_08808 [Pseudogymnoascus sp. VKM F-103]

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 7, en la región génica delimitada para el cluster 28.2, se encontraron 15 marcos de lectura abiertos. De todos éstos, sólo 5 mostraron importantes porcentajes de identidad con secuencias asociadas a funciones en el metabolismo de sideróforos; g8 evidenció un 72.46% de identidad con la secuencia nucleotídica de una lipasa esterasa, cuya función normalmente se relaciona con la catálisis del último paso de adquisición de ion férrico mediante la hidrólisis de sideróforos (Curci et al., 2019), g10 un 76,52% con un transportador de sideróforos, g11 un 81,99% con una ClpP/crotonasa, g12 un 75,45% con un gen codificante para una acetiltransferasa SidF y, finalmente, g13 un 78,91% con un gen cuyo producto génico corresponde a un transportador ABC SidT.

En resumen, se identificaron dos posibles NRPSs sideróforas y algunos genes del metabolismo de sideróforos en las regiones génicas asociadas a estas NRPS, siendo éstos:

- 1) GymA, la cual codificaría para una NRPS siderófora implicada en la biosíntesis de sideróforos de tipo ferricromos, es decir, de tipo intracelular. Esto quiere decir, que el producto génico de GymA podría actuar a nivel del tercer paso de biosíntesis de sideróforos de tipo hidroxamato (Veáse Introducción). Además,

un marco de lectura abierto en la misma región de GymA presentó 51,96% de identidad con una secuencia codificante para una L-ornitina N5-oxigenasa (SidA), enzima implicada en el primer paso en la ruta de biosíntesis de los sideróforos de tipo hidroxamato.

- 2) GymE, cuyo producto génico correspondería a una NRPS implicada en la biosíntesis de sideróforos extracelulares, posiblemente, de tipo fusarinina. Además, g8 evidenció un 72.46% con una lipasa esterasa del metabolismo de sideróforos (g8), un transportador de sideróforos (g10), una ClpP/crotonasa (g11) , un gen codificante para una acetiltransferasa SidF (g12) y un posible transportador ABC SidT(g13) (Hai et al., 2020; Oide et al., 2006).

La segunda estrategia utilizada se basó en el hongo modelo de estudio *A. fumigatus*, ya que en este organismo se ha caracterizado una gran cantidad de genes de biosíntesis, de transporte y regulación de sideróforos (Haas, 2014; Le Govic et al., 2019). De acuerdo con esto, se usaron las secuencias de dichos genes para realizar una serie de alineamientos contra el genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, utilizando como herramienta BLASTn. Considerando las regiones de alineamiento identificadas, se evaluaron con Augustus, una herramienta bioinformática de predicción de marcos de lectura abiertos (ORF's), los ORF's presentes en dichas posiciones.

Una vez identificados los genes de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB que presentaron alineamientos significativos con las secuencias de los genes de *A. fumigatus*, se realizaron diversos alineamientos utilizando la herramienta BLASTx (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultados del análisis por BLASTx de las secuencias del metabolismo de obtención de hierro por sideróforos identificadas en *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB utilizando genes de *A. fumigatus*.

Gen	Función	Contig	% Identidad	Resultado BLASTx	Código acceso GenBank
<b>sidA</b>	L-ornitina-monooxigenasa	1	51,96%	L-ornitina N5-oxigenasa sida [ <i>Chalara longipes</i> BDJ]	KAE9371368.1
<b>sidF</b>	Hidroxiornitina transacilasa	6	75.45%	Acetiltransferasa SidF [ <i>Talaromyces marneffe</i> ATCC 18224]	XP_002152436.1
<b>sidH</b>	Mevalonil-coA hidratasa	6	81.99%	ClpP/crotonasa [ <i>Aspergillus ellipticus</i> CBS 707.79]	PYH91753.1
<b>sidL</b>	Transacetilasa	20	56.27%	N(6)-hidroxilysina O-acetiltransferasa [ <i>Lachnellula hyalina</i> ]	XP_031005995.1
<b>sidI</b>	Mevalonil-CoA ligasa	6	69,21%	acil-CoA sintetasa/AMP-ligasa ácido como proteína III [ <i>Hyaloscypha variabilis</i> F]	PMD30777.1
<b>sidJ</b>	Lipasa/Esterasa	6	72.46%	Lipasa/esterasa de biosíntesis de sideróforos [ <i>Aspergillus</i> sp. HF37]	RMJ28842.1
<b>mirB</b>	Transportador MFS	6	76.90%	Transportador de sideróforos [ <i>Trichoderma guizhouense</i> ]	OPB40724.1
<b>mirD</b>	Transportador MFS	23	59,25%	Transportador MFS [ <i>Rhizodiscina lignyota</i> ]	KAF2101793.1
<b>sitT</b>	Transportador tipo ABC	6	78.88%	Transportador ABC sitT [ <i>Aspergillus fischeri</i> NRRL 181]	XP_001259094.1
<b>agaA</b>	Arginasa	0	99,39%	Arginasa [ <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> ]	XP_018127227.1

<b><i>mpka</i></b>	MAP quinasa A	2	100%	Proteína quinasa CMGC/MAPK [ <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> ]	XP_018126132.1
<b><i>pacC</i></b>	Factor de transcripción Cys2His2	0	61.33%	Factor de transcripción de respuesta a pH pacC [ <i>Lachnellula cervina</i> ]	TVY52035.1
<b><i>hapX</i></b>	Factor de transcripción bZip	7	51.70%	Factor de transcripción hapX [ <i>Diplocarpon rosae</i> ]	PBP17015.1

De acuerdo con esto, se encontró la secuencia de 13 genes implicados en el metabolismo de sideróforos; siendo potencialmente 6 de biosíntesis, 3 de transporte y 4 de regulación. Todos presentaron altos porcentajes de identidad con genes de funciones conocidas en la ruta de interés, encontrándose algunos en la misma región génica.

Adicionalmente, en esta segunda estrategia se utilizaron como “query” las secuencias de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de TAFC y Ferricromo en *Pseudogymnoascus destructans* (Mascuch et al., 2015).

Este acercamiento permitió encontrar, 5 potenciales nuevos genes; siendo 2 de biosíntesis, 2 de transporte y 1 de regulación (Tabla 9). Estos genes se encontraron en regiones génicas diferentes a las previamente descritas (Tabla 8) y presentaron altos porcentajes de identidad con las secuencias de genes con las funciones bioquímicas esperadas.

**Tabla 9.** Resultados del análisis por BLASTx de las secuencias del metabolismo de obtención de hierro por sideróforos identificadas en *Pseudogymnoascus sp.* 131209-E2A-C5II-EB utilizando genes de *P. destructans*.

Gen	Función	Contig	% Identidad	Resultado BLASTx	Código acceso GenBank
-----	---------	--------	-------------	------------------	-----------------------

<b><i>sidG</i></b>	Transacetilasa	7	64,02%	Acetiltransferasa de la familia GNAT [ <i>Aspergillus arachidicola</i> ]	PIG89272.1
<b><i>mirB</i></b>	Transportador sideróforos	7	72,71%	Transportador de sideróforos MirB [ <i>Aspergillus uvarum</i> CBS]	XP_025491372.1
<b><i>fso1</i></b>	Aciltransferasa putativa	9	73,94%	Proteína relacionada a un dominio WW [Phialocephala subalpina]	CZR50679.1
<b><i>ace1</i></b>	Factor de transcripción C2H2	19	89,32%	Factor de transcripción de unión a cobre [ <i>Pseudogymnoascus destructans</i> ]	XP_024324412.1
<b><i>sit1</i></b>	Transportador tipo ABC	14	90,10%	Transportador de sideróforos [ <i>Pseudogymnoascus destructans</i> ]	XP_024327320.1

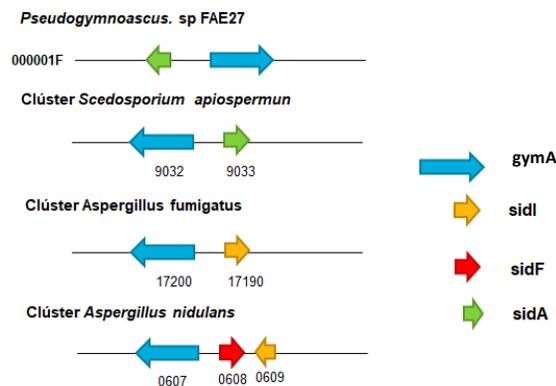
Hubo algunos genes que fueron identificados con ambas propuestas de búsqueda utilizadas en la segunda estrategia aplicada, siendo estos genes asociados a las potenciales funciones de SidA, actividad enzimática implicada en el primer paso de biosíntesis de sideróforos de tipo hidroxamato y SidF, una acetiltransferasa.

Particularmente, en la búsqueda de *sidG* utilizando como guía el transcrito del gen encontrado en *A. fumigatus*, se identificó homología de secuencia en el contig 7 y al buscar la secuencia del gen identificado como candidato, se visualizó que los resultados de BLASTx indicaban otras funciones bioquímicas (datos no mostrados). En cambio, al utilizar como guía el gen caracterizado como ortólogo de *sidG* en *P. destructans*, se observó homología con otra región de este contig y al evaluar los

resultados de BLASTx del gen candidato con esta función, efectivamente se visualizó un alto porcentaje de identidad con genes con la actividad buscada.

Considerando la información sobre las potenciales posiciones de estos genes (Tabla 8 y 9) y las descritas para GymE y GymA (Tabla 5, 6 y 7) obtenidas con las estrategias aplicadas, se pudo proponer una organización de la gran parte de estos genes en dos regiones: 1) Clúster génico *gymA* (Figura 3) y 2) Clúster génico de *gymE* (Figura 4).

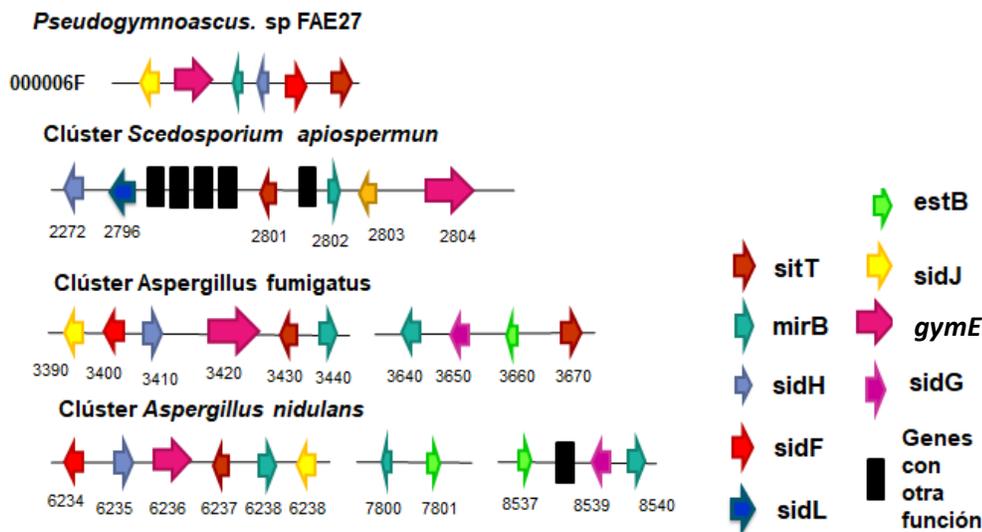
En el caso del cluster génico *gymA*, los resultados indican que podría corresponder a una NRPS implicada en la biosíntesis de sideróforos intracelulares. Utilizando la secuencia de los genes implicados tanto en el metabolismo de sideróforos en *A. fumigatus* como en el de *P. destructans*, se identificó una secuencia nucleotídica en la región génica cercana a GymA de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB con una alto porcentaje de identidad de secuencia a SidA, una ornitina N5-monooxigenasa, clave en la biosíntesis de sideróforos de tipo hidroxamato (Haas, 2014).



**Figura 3.** Comparación de clusters génicos fúngicos de sideróforos intracelulares con el cluster de *gymA*. Los números indicados bajos los genes corresponden al número de gen del organismo evaluado y los genes codificantes de NRPSs intracelulares en los otros organismos ilustrados se muestran en la misma condición de *gymA* para facilitar su análisis. *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB se ilustra con su nombre abreviado de *Pseudogymnoascus* sp. FAE27

Los módulos, e incluso clusters completos implicados en la biosíntesis de un metabolito secundario, suelen ser compartidos por especies divergentes. Esto puede ser un indicador de función compartida o similar (Gluck-Thaler et al., 2020). Debido a esto, comparar la organización de los elementos génicos potencialmente organizados en un cluster con el gen codificante para GymA con otros clusters descritos y caracterizados, podría entregar aún más datos sobre su posible función. Por lo tanto, al analizar clusters biosintéticos de sideróforos intracelulares reportados (Figura 3), es posible establecer que el cluster de *gymA* presenta gran similitud con el observado en *Scedosporium apiospermum*, el cual estaría bioinformáticamente relacionado a la potencial producción de ferricrocina, un sideróforo intracelular de tipo ferricromo (Le Govic et al., 2018).

Por otro lado, en el clúster génico de GymE (Figura 4), se encontrarían: 1) SidJ, una lipasa/esterasa, 2) NPS6, la NRPS GymE, 3) MirB, un transportador de sideróforos, 3) SidH, una mevalonil-coA hidratasa, 4) SidF, una ~~transacetilasa~~ *gymA* y 5) SitT, un transportador de sideróforos. Al igual que se hizo con el cluster de *gymA*, se comparó la arquitectura génica del cluster de *gymE* con otros clusters reportados de sideróforos extracelulares, encontrándose similitud con los clusters de organismos fúngicos como *Scedosporium apiospermum*, *A. fumigatus* y *A. nidulans* (Figura 4).



**Figura 4.** Comparación de clusters génicos de sideróforos extracelulares fúngicos con el cluster de *gymE*. En el cuadro azul es posible notar la posición exacta y tamaño predicho de cada gen en el *contig* indicado. Los números indicados bajos los genes corresponden al número de gen del organismo evaluado y los genes codificantes de NRPSs extracelulares en los otros organismos ilustrados se muestran en la misma condición de *gymE* para facilitar su análisis. *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB se ilustra con su nombre abreviado de *Pseudogymnoascus* sp. FAE27

Como resultado se observó que la mayor parte de los genes identificados que integran el cluster de *GymE* tiene relación con la biosíntesis o el transporte de sideróforos extracelulares de tipo fusarinina. Adicionalmente, se pudo constatar que, si bien existía esta similitud a nivel de secuencia, la arquitectura del cluster de *gymE* era muy diferente respecto a estos clusters de biosíntesis de fusarininas.

Por otro lado, en el estudio bioinformático realizado por Palmer y colaboradores citado previamente, se propone la existencia de un cluster de sideróforos en *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13 asociado a la producción de fusarinina C, el cual posee similitud con la propuesta de clúster de *gymE* (Palmer et al., 2018). Al comparar ambos clusters se encontró que, entre otras diferencias, la secuencia potencialmente similar a *sidF* presente en el cluster de *gymE* en *Pseudogymnoascus* sp.

131209-E2A-C5II-EB no fue encontrada en *Pseudogymnoascus* sp. 24MN14. Es importante indicar que estudios previos realizados en nuestro laboratorio con el genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13, evidenciaron que este genoma tiene una completitud baja en comparación con los de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, *P. verrucosus* y *P. destructans* (Datos no mostrados). Por lo tanto, es un resultado esperable que falten genes en este genoma, complejizando el análisis de la posible relación de estos clusters y su función.

Así, en base a todos los elementos expuestos, es posible sugerir que los genes presentes en el cluster de *gymE*, están implicados en la biosíntesis de sideróforos extracelulares de tipo fusarininas en *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB

Por otro lado, los resultados sugieren que GymE podría corresponder a una NRPS implicada en la biosíntesis de sideróforos extracelulares, debido al alto porcentaje de similitud de secuencia de un gen codificante para una enzima de tipo NPS6, clave en el en la biosíntesis de sideróforos de tipo coprogeno y derivados (Hai et al., 2020). Además, utilizando tanto la información de antiSMASH como la de los genes implicados en el metabolismo de sideróforos en *A. fumigatus* y en *P. destructans*, se encontró una secuencia nucleotídica en la región génica próxima a GymE con alto porcentaje de identidad de secuencia con *sidF*, un gen codificante para una acetiltransferasa implicada en la adición anhidromevalonil a la N5-hidroxiornitina (Haas, 2014).

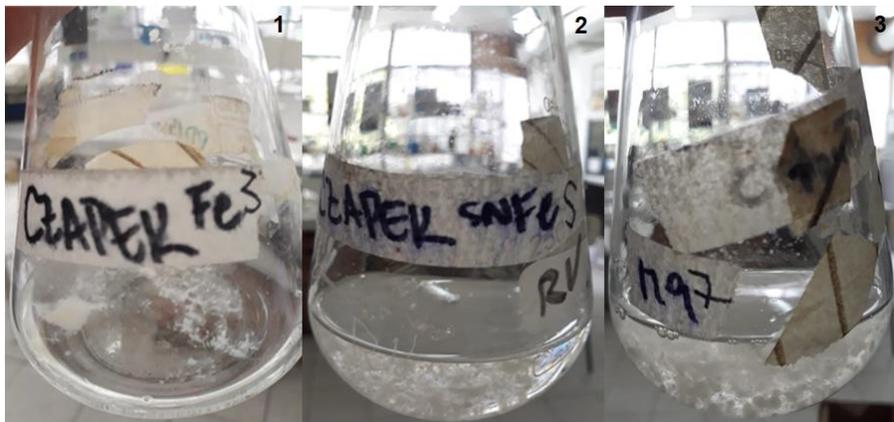
Por último, genes que se encontraron con ambas estrategias, antiSMASH y la búsqueda guiada utilizando los genes de *A. fumigatus* (*sidH*, *sidJ* y *mirB*), otros sólo se encontraron utilizando los genes de *A. fumigatus* (*sidL*, *sidI*, *agaA*, *mpkA*, *pacC* y *hapX*)

y por último, otros únicamente utilizando los genes de *P. destructans* (*sidG*, *mirB*, *fso1*, *ace1* y *sitT*).

## 2 Evaluación de la producción de sideróforos de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en distintos medios de cultivo.

La síntesis de sideróforos está fuertemente regulada por las condiciones de cultivo del organismo productor. Para encontrar un medio de cultivo óptimo para la biosíntesis de sideróforos en *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, se efectuaron fermentaciones de la cepa en tres medios mínimos de cultivo diferentes (Figura 5).

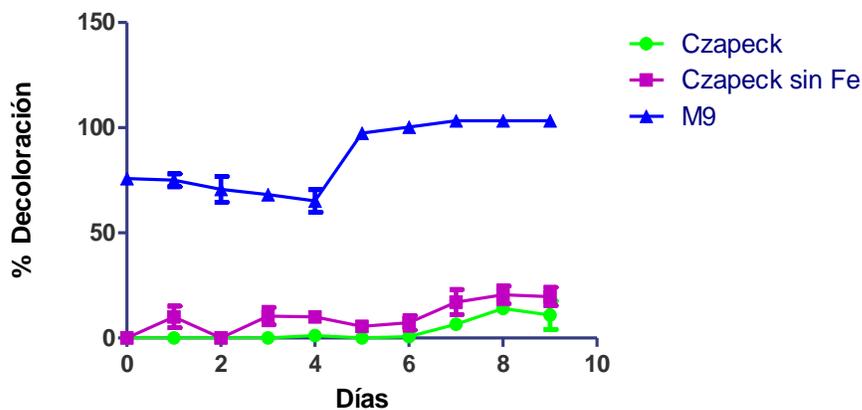
Los cultivos se realizaron utilizando un preinóculo de tres días para asegurar una cantidad de material biológico suficiente al inicio de la fermentación. Luego, la fermentación se mantuvo por 9 días, tomándose cada día una muestra de 1 mL de caldo de cultivo.



**Figura 5.** Cultivos de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en tres medios líquidos diferentes para la producción de sideróforos. Las imágenes corresponden a: (1) Medio Czapeck (con 36  $\mu$ M de cloruro férrico), (2) Medio Czapeck (sin adición de hierro) y (3) Medio M9.

Posteriormente, se efectuó el ensayo CAS (B. Neilands, 1987), el cual utiliza el Cromoazurol S (CAS) en presencia de HDTMA como un indicador de la actividad de quelantes de hierro.

El complejo CAS/HDTMA/i3n f3rrico, presenta un color azul caracter3stico y cuando un fuerte quelante de hierro, como lo son los compuestos sider3foros, remueve el Fe<sup>+3</sup> de este complejo, se origina un cambio de coloraci3n de azul a naranja o amarillo. Esto con el fin de comparar los valores de porcentajes de decoloraci3n en estos cultivos a lo largo del tiempo. Los resultados de este ensayo se grafica en la Figura 6.



**Figura 6.** Porcentaje de decoloraci3n del caldo de cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en funci3n de los d3as de fermentaci3n. Los cultivos fueron realizados en medios Czapeck (36  $\mu$ M de cloruro f3rrico) (verde), Czapeck sin Fe (morado) y Medio M9 (azul) (n=3).

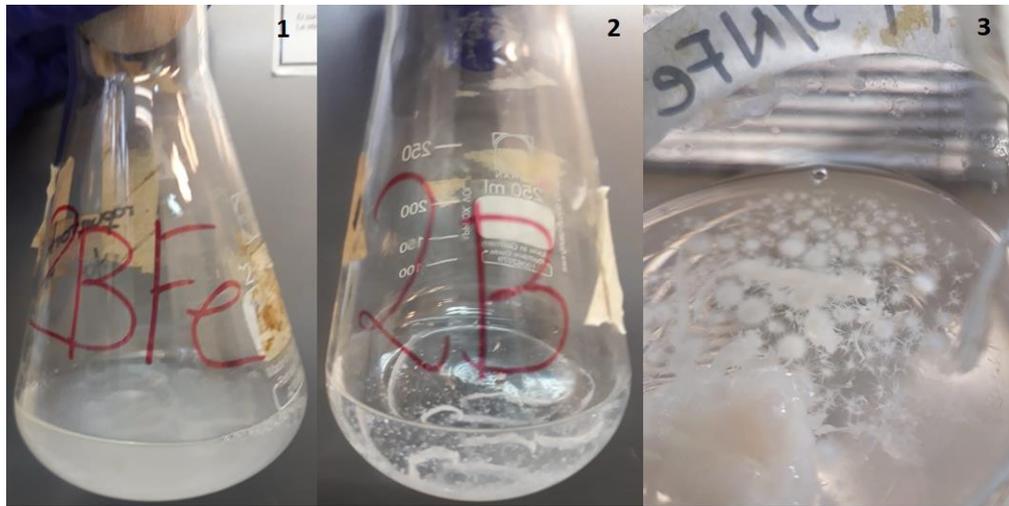
Al visualizar los cultivos realizados con los tres medios probados (Figura 5), no se observ3 ninguna diferencia morfol3gica notoria entre ellos. Por el contrario, el porcentaje de decoloraci3n presenta diferencias claras (Figura 6). En concreto, el porcentaje de decoloraci3n en el medio M9 es much3simo mayor a lo observado en los medios Czapeck (36  $\mu$ M de cloruro f3rrico) y Czapeck sin Fe, lo que implicar3a que esta condici3n de cultivo induce la producci3n de compuestos sider3foros de forma significativa, a diferencia de los otros dos medios. Adem3s, se detect3 que al quinto d3a de cultivo en medio M9, se pas3 de un 65 % de decoloraci3n hasta el 100% de

coloración, porcentaje que mantuvo constante hasta el noveno día, es decir, el último día evaluado. Debido a esto, la condición óptima de cultivo para la producción de sideróforo se definió con medio M9, sin preinóculo (ver Discusión) y con un tiempo de cultivo no menor a 5 días.

### **3 Evaluación de la expresión del gen *gymE* y de la presencia de sideróforos en medios de cultivo con y sin Fe<sup>+3</sup>**

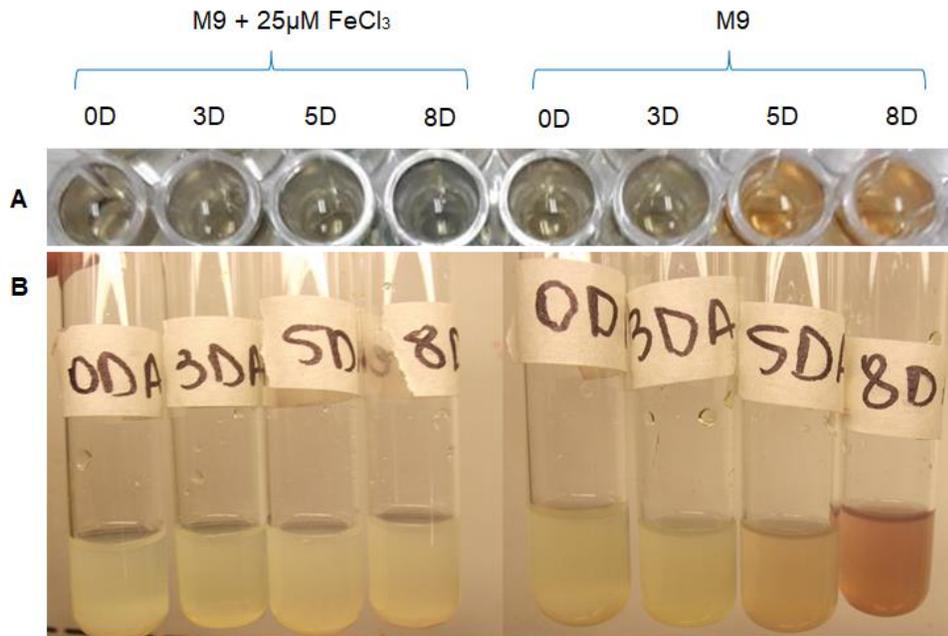
Se ha establecido que la concentración de Fe<sup>+3</sup> es un factor crítico en la producción de sideróforos, ya que concentraciones del orden nanomolar pueden inhibir la producción de estos compuestos (Dave & Dubc, 2000). Por lo tanto, una vez definido el medio de cultivo óptimo para la biosíntesis de sideróforos, se consideró importante evaluar como ésta era afectada por la concentración de una fuente de hierro agregada externamente. Ello nos permitiría evaluar además la relación entre la presencia o no de sideróforos en el caldo de cultivo con la expresión de uno de los genes propuestos como codificantes de NRPS sideróforas, el gen *gymE*.

Así, se efectuaron cultivos en medio M9 y M9 suplementado con 25 µM de FeCl<sub>3</sub> (Figura 7). Durante la fermentación se tomaron muestras a 5 y 8 días para evaluar la presencia de sideróforos en los caldos de cultivo mediante ensayos colorimétricos (ensayo CAS y ensayo del FeCl<sub>3</sub>) y para evaluar la expresión de *gymE* empleando los micelios de esos mismos caldos de cultivo.



**Figura 7.** Cultivos de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB para estudios genéticos y químicos de sideróforos. Los distintos medios utilizados son medios M9 con 25 $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub> (1), medio M9 (2) y un acercamiento para la visualización, a ojo desnudo, de las características morfológicas del micelio en medio M9 (3) (n= 3).

Al visualizar los cultivos en las condiciones evaluadas (Figura 7), se evidenció que el crecimiento en M9 con 25 $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub> generó una mayor cantidad de micelio. Por otro lado, los resultados de los ensayos colorimétricos efectuados en los caldos de cultivo de las dos condiciones evaluadas (Figura 8), mostraron diferencias claras.

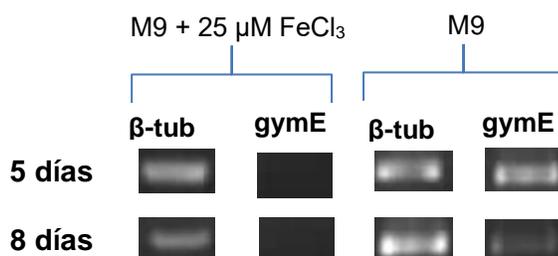


**Figura 8.** Evaluación de la presencia de sideróforos mediante ensayos químicos colorimétricos en caldos de cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en medio M9 suplementado con 25 µM de FeCl<sub>3</sub> y medio M9. En (A) se muestran los resultados del ensayo CAS para los caldos de cada día de fermentación y en (B) los resultados del ensayo de cloruro férrico para esos mismos caldos. 0D, 3D, 5D y 8D refieren a la cantidad de días correspondiendo a cero, tres, cinco y ocho días, respectivamente.

El ensayo CAS (Figura 8.A) mostró resultados negativos, es decir, mostró la ausencia de compuestos sideróforos quelantes de ión férrico en el caldo de cultivo en todos los días evaluados en medio M9 suplementado con 25 µM FeCl<sub>3</sub>. En cambio, en medio M9, se observó un cambio de coloración evidente en el quinto y octavo día (paso de tonalidad azulada a amarilla) indicando, por tanto, la presencia de compuestos sideróforos en estos caldos. Por otro lado, los ensayos de cloruro férrico (Figura 8.B) concordaron con los resultados mostrados por el ensayo CAS: los caldos de cultivo de la fermentación en medio M9 suplementado con 25 µM FeCl<sub>3</sub> dieron resultado negativo para todos los días de la fermentación (no se observa cambio en la coloración), mientras que se observó un cambio de coloración (desde amarillo a tonalidades

rojizas) en los días 5 y 8 de la fermentación realizada en medio M9. Esto indicó un resultado positivo de presencia de sideróforos en los días 5 y 8 en cultivos en medio M9.

Posteriormente, se evaluó la expresión del gen candidato de la NRPS siderófora *GymE* en los micelios de los cultivos en las condiciones estudiadas (Figura 9).



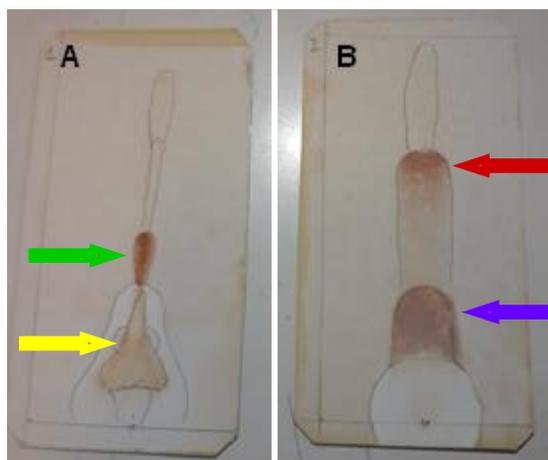
**Figura 9.** RT-PCR del gen *gymE* en micelio colectado tras 5 y 8 días de cultivo y en medios con ausencia o presencia de 25 μM FeCl<sub>3</sub>. Como control de expresión se utilizó el gen constitutivo de la beta-tubulina (β-tub) (n=3).

En el caso de los cultivos suplementados con cloruro férrico, se observó de forma cualitativa que el gen constitutivo de la beta-tubulina se expresa en los dos días evaluados, mientras que *gymE* no se expresa en esta condición. Por otro lado, en los cultivos realizados utilizando medio M9 (y, por tanto, en ausencia de Fe<sup>+3</sup>), se observa la expresión del gen control, así como de *gymE* en ambos días evaluados. Esto permite establecer que en los cultivos en los que se añadió 25 μM FeCl<sub>3</sub> al caldo de cultivo, hay presencia de sideróforos y expresión de *gymE*. Por el contrario, en ausencia de 25 μM FeCl<sub>3</sub> en el caldo de cultivo, no se observa presencia de sideróforos en los caldos de cultivo y *gymE* no se expresa.

#### 4 Separación de compuestos sideróforos en cromatografía en capa fina

Con el fin de separar y visualizar de forma sencilla los potenciales compuestos sideróforos de un caldo de cultivo (Hayen & Volmer, 2005), se realizó un ensayo de

cromatografía en capa fina utilizando como muestra 50  $\mu\text{L}$  de un concentrado de 600  $\mu\text{L}$  de volumen proveniente de 30 mL de caldo de cultivo de una fermentación en medio M9 sin hierro de 8 días (Figura 10). Esta muestra se dispuso en el punto de aplicación y fue aplicada en dos placas de sílica gel analíticas idénticas. Luego, estas placas fueron eluidas con distintas mezclas de solventes para evaluar la eficacia de la separación de los sideróforos de cada una de ellas (Figura 10).



**Figura 10.** Cromatografía en capa fina para separación de sideróforos. (A) Placa CCF eluida con una mezcla de butanol/ácido acético/agua (12:3:5) y (B) Placa CCF eluida con una mezcla de 2-propanol/metanol/agua/ácido acético (8:1:0,5:0,5). Ambas placas se revelaron utilizando un revelador de 1% de  $\text{FeCl}_3$  en etanol. Obsérvese las manchas de tonalidad rojiza, indicativas de presencia de compuestos sideróforos, las cuales se encuentran nombradas por área e indicadas de la siguiente forma: (A.1, flecha verde), (A.2, flecha amarilla), (B.1, flecha roja) y (B.2, flecha azul).

Considerando que la presencia de compuestos sideróforos se evalúa en base a la aparición de color, tras la aplicación de una solución de cloruro férrico (Véase Materiales y Métodos, Sección 6), se observa inmediatamente que los patrones, posiciones y formas de las concentraciones de color, en las condiciones probadas, son diferentes. Particularmente, en la placa eluida con la mezcla de butanol/ácido acético/agua (12:3:5) (Figura 10.A), se visualizan 2 puntos concretos de concentración de color, indicados como A.1 y A.2.. La coloración de estos puntos varía,

concentrándose densamente un color tipo vino, asociada a sideróforos de tipo hidroxamato, en una región de pequeña área en la parte central de la placa (Figura 10.A, área A.1) mientras que una coloración más naranja (Figura 10.A, área A.2), asociada a la presencia de compuestos sideróforos de tipo catecolatos, en la parte central inferior de la misma (Memon, 2005). Por otro lado, en la placa eluída con mezcla de 2-propanol/metanol/agua/ácido acético (8:1:0,5:0,5) (Figura 10.B, área B.1 y B.2), se observan 2 puntos de concentración de coloración, todos ubicados en la parte central de la placa y con una evidente coloración tipo vino, que, a inferior de cada punto, se torna un poco más anaranjada. Además, las áreas abarcadas por estas “manchas” presentan un tamaño mayor a lo observado en la otra condición probada. En base a esto, se eligió la elución con 2-propanol/metanol/agua/ácido acético (8:1:0,5:0,5), como favorable en términos de la separación de las manchas y, por tanto, una purificación de los posibles compuestos encontrados.

Posteriormente, como primera estrategia para separar los sideróforos presentes en el caldo de cultivo, se realizó una cromatografía en placa preparativa, contemplando la elución elegida. Sin embargo, la separación no fue exitosa debido a que hubo problemas para recuperar los productos de la sílica y, lo que se logró recuperar, se encontró parcialmente degradado, descartando la futura purificación de posibles compuestos sideróforos de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB con este método (Resultados no mostrados).

## **5 Análisis de los caldos de las fermentaciones de la cepa *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB mediante HPLC**

Con el objetivo de separar y caracterizar los sideróforos producidos por *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, se analizaron mediante HPLC analítico

muestras de los caldos en medio M9 tras 5 (Figura 1, Anexo) y 8 días (Figura 2, Anexo) de cultivo.

Al comparar los perfiles podemos identificar 4 picos cromatográficos que corresponden a compuestos que están presentes únicamente en los caldos de la fermentación realizada en ausencia de hierro, y cuya concentración se incrementa a los 8 días de cultivo. Estos compuestos se identificaron por sus tiempos de retención: compuesto 1 (RT 7,362 min), compuesto 2 (RT 8,094 min), compuesto 3 (RT 9,911 min) y compuesto 4 (RT 10,596 min). Considerando que los compuestos sideróforos de tipo hidroxamato presentan un máximo de absorbancia característica a 440 nm (Vala et al., 2006), mientras que los de tipo catecolatos presentan un máximo de absorbancia a 485 nm (Vala et al., 2006), para cada compuesto identificado como posible sideróforo se obtuvo su respectivo su espectro de absorción UV-Visible (Figura 3, Anexo). Con ello pudimos clasificar los compuestos de interés según la presencia de estos máximos de absorción característicos: los compuestos 3 y 4 presentan una naturaleza química similar, posiblemente siendo de tipo hidroxamato, observándose algo similar para los compuestos 1 y 2, los que podrían corresponder a sideróforos de tipo catecolatos.

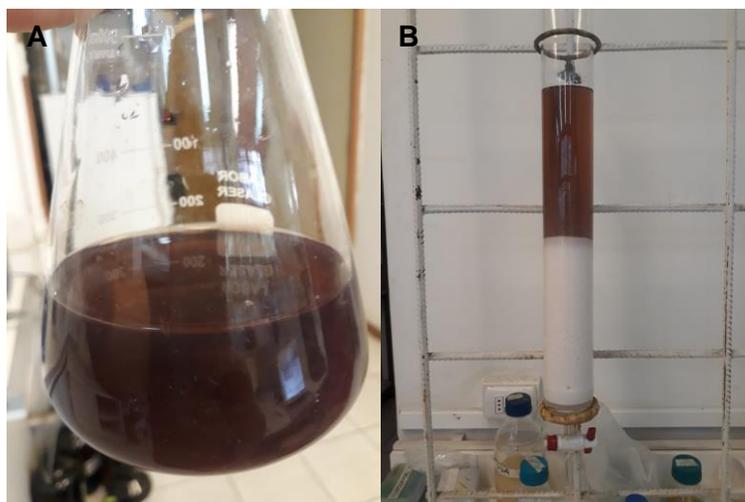
Posteriormente, se evaluó el efecto de la cantidad de solución de cloruro férrico acuoso al 1% añadido para la estabilización de los compuestos sideróforos. Para esto se compararon los perfiles del mismo caldo de cultivo (medio M9 sin cloruro férrico y 8 días de fermentación) tratado con 2 y 5 mL de solución de  $\text{FeCl}_3$  (Figura 4 y 5, Anexo). Se pudo observar que la absorbancia de los compuestos 3 y 4 eran similares en ambas condiciones, mientras que la de los compuestos 1 y 2 presentaban una absorbancia notoriamente mayor al tratar el caldo con 5 mL de solución de cloruro férrico. Ello podría sugerir que el aumento de concentración de hierro disponible para quelar los

compuestos sideróforos, favorece más a la estabilidad de estos compuestos, aumentando considerablemente su presencia en la muestra.

Por último, se estudió el efecto que tendría la realización de un paso de purificación mediante la utilización de una columna de XAD16, previo al aislamiento de los compuestos de interés con HPLC semipreparativo. Para esto, se utilizó la misma muestra de 8 días de cultivo, tratada con 5 mL de solución acuosa al 1% de  $\text{FeCl}_3$ . Al eluir el extracto por la columna XAD16 (Figura 5, Anexo) se consigue un extracto enriquecido en los compuestos sideróforos detectados (presentan mayor absorbancia).. Aun cuando se observa un leve desplazamiento en el tiempo de retención del compuesto 1, el patrón del peak es el mismo. Por tanto, este paso previo permite obtener un extracto más adecuado para la purificación de los compuestos mediante el HPLC semipreparativo.

## **6 Purificación de potenciales compuestos sideróforos**

Una vez lograda la identificación de los compuestos que, dados los parámetros evaluados, presentaban la posibilidad de corresponder a sideróforos, se procedió al aislamiento de dichos compuestos (ver detalles de este proceso experimental en la sección 8.1). En primer lugar, se realizó un cultivo de 0,5 L en medio M9, el cual fue concentrado tras 8 días de cultivo rindiendo una masa de extracto de 2 gramos. Este extracto se disolvió en 250 mL de solución de cloruro férrico acuosa al 1%, adquiriendo el extracto el mismo color vino visto en los ensayos de cromatografía de capa fina (Figura 11.A). Luego, esta solución se pasó a través de una columna XAD16 (Figura 11.B). Tras el correspondiente lavado, se eluyeron los compuestos adheridos a la columna con metanol y esta solución se concentró originando un extracto de 0,2073 gramos.



**Figura 11.** Proceso de purificación de sideróforos. (A) Adición de solución acuosa de cloruro férrico a 1% al caldo de cultivo concentrado para quelar los sideróforos y (B) Separación de sideróforos empleando columna de XAD 16.

Posteriormente, se evaluó el perfil de este extracto en el HPLC empleando una columna C18 analítica y una columna C18 semipreparativa, dos columnas que presentan como única diferencia distinto diámetro (ver detalles en materiales y métodos en la sección 8.1).

En la comparación de estos perfiles, utilizando la misma cantidad de inyección (Véase Materiales y Métodos) (Figura 6, Anexo), se observó que, si bien existía un leve desplazamiento de RT de los peaks cromatográficos, se podían identificar los mismos potenciales compuestos sideróforos detectados con anterioridad.

De igual forma, con el fin de confirmar esta asignación, se analizaron los espectros UV-visible de cada compuesto (Figura 7, Anexo) y, considerando los cuatro compuestos identificados tras la elución en el HPLC analítico, siendo estos: compuesto 1 (RT 7,362), compuesto 2 (RT 8,094), compuesto 3 (RT 9,911) y compuesto 4 (RT 10,596) (Figura 7, Anexo), se observa que en el HPLC semipreparativo (Figura 6, Anexo) el compuesto 1 y 2 presentaron RT casi idénticos, siendo estos 7,377 y 8,060,

respectivamente. En cambio, los compuestos 3 y 4 sufrieron un leve desplazamiento, obteniendo valores de 9,600 y 10,283, respectivamente. Los máximos de absorción en los cuatro peaks en ambos casos se ven prácticamente iguales, corroborando que son los mismos.

Así, se procedió a separar cada uno de los cuatro compuestos desde los 207,3 mg de extracto, colectando el eluido de la columna semipreparativa a cada uno de los tiempos de retención determinados. Una vez obtenidas las cuatro fracciones, cada una de ellas correspondientes a uno de los compuestos, fueron analizadas en el HPLC analítico con el fin de comprobar la efectividad de la purificación.

En el caso de la fracción con el compuesto 1 (RT 7,362), el cromatograma (Figura 8, Anexo) mostró la presencia de un único pico cromatográfico al tiempo de retención esperado. Dado que además el espectro de absorción UV-Visible asociado a esta fracción (Figura 9, Anexo), es análogo a lo registrado previamente, podemos afirmar que el compuesto 1 fue aislado con un alto porcentaje de pureza. Al concentrar este eluido obtuvimos 2,66 mg del Compuesto 1.

En el caso de la fracción asociada al compuesto 2 (RT 8,094) en el cromatograma a 440 nm y el espectro de absorción UV-Visible, se evidenció la presencia de tres peaks de baja amplitud y muy cercanos entre sí (datos no mostrados) y la ausencia del perfil identificado para el compuesto 2. Debido a esto, se estableció que el compuesto de interés se perdió en el proceso de purificación, por lo que se descartó cualquier análisis posterior.

Por otro lado, la fracción asociada a la purificación del compuesto 3 (RT 9,911) presentó 5 peaks en su cromatograma a 440 nm (Figura 10, Anexo). Respecto a esto,

se identificó que la señal de mayor absorbancia correspondería al perfil del compuesto de interés (Figura 11, Anexo), mientras que las otras, con absorbancias muy menores, serían impurezas presentes en la muestra. Al concentrar este eluido obtuvimos 2,36 mg de compuesto 3.

Por último, en el caso del compuesto 4 (RT 10,596), se visualizó la presencia de 3 picos en el cromatograma a 440 nm (Figura 12, Anexo). Aun cuando uno presenta una amplitud considerablemente mayor a los otros dos, estos se encuentran extremadamente cercanos entre sí. Por esta razón, la purificación se repitió para esta fracción.

Tras la repetición del procedimiento, se logró colectar el pico asociado al compuesto 4 (RT 10,596). Pese a que en el cromatograma de esta nueva fracción se puede ver que el compuesto aun no está completamente aislado de los picos asociados a otros compuestos (Figura 13, Anexo), es el compuesto mayoritario, por lo que se consideró suficiente para proseguir con los siguientes análisis químicos.

Al visualizar el espectro UV-visible del compuesto 4 (RT 10,596) tras la segunda purificación (Figura 14, Anexo), se corroboró la obtención del compuesto. Al concentrar este eluido obtuvimos 2,14 mg de compuesto 4.

## **7. Análisis de espectrometría de masas de alta resolución**

Con el fin de realizar la identificación de los tres potenciales compuestos sideróforos aislados, se realizaron análisis de espectrometría de masas de baja (LRMS) y alta (HRMS) resolución.

Mediante los análisis LRMS, se verificó que los compuestos aislados poseían las señales características de un compuesto quelado con hierro, es decir, que se podían localizar las señales isotópicas del hierro ( $^{54}\text{Fe}$ ,  $^{56}\text{Fe}$ ) o la forma desférrica y férrica.

El peso molecular de cada compuesto, calculado considerando la masa del compuesto desquelado y la masa de 3 protones adicionales, en la posición anteriormente utilizada por el hierro, al igual que los otros datos recopilados de la espectrometría de masas y la presencia de información de cada compuesto aislado en bases de datos, se puede ver ilustrado en la Tabla 9. Los espectros de masas asociados a cada compuesto se adjuntan en el Anexo (Figura 15, 16, 17, 18 y 19, Anexo)

**Tabla 9.** Resumen de compuestos identificados

Compuesto	RT	Masa final obtenida [mg]	Especie identificada	[M+Fe] m/z	[M+3H] Da	Información en base de datos
1	7,362	2,66	Compuesto 1	640,2020	587.3785	No encontrada
3	9,911	2,36	Compuesto 3.1	430,9125	378,0890	No encontrada
			Compuesto 3.2	566,8868	504.0633	No encontrada
4	10,596	2,14	Compuesto 4	928,3112	875.4877	No encontrada

## DISCUSIÓN

Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular sintetizados por diversos organismos para la captación de hierro en el ambiente y la entrega de éste mediante receptores específicos (Fan & Fang, 2021). Nuevos descubrimientos, respecto a las bases moleculares de la regulación, síntesis, secreción y recaptación de estos compuestos, han causado gran expectación respecto posibles aplicaciones de los sideróforos, especialmente en el área médica. Un ejemplo de esto se ha visto en la

utilización de conjugados sideróforos-antibióticos contra organismos multirresistentes, resultando en una estrategia bastante efectiva y novedosa (Fan & Fang, 2021).

Para identificar nuevos compuestos sideróforos, se deben considerar dos etapas. Primero, es necesario controlar las condiciones de cultivo para que toda la cascada de reacciones bioquímicas que lleva a la formación de estos compuestos tenga lugar tras la activación de todos los genes codificantes para el sistema de obtención de hierro mediada por sideróforos. Segundo, los sideróforos producidos deben ser aislados e identificados mediante técnicas fisicoquímicas, tales como la espectrometría de masas, que permitan su caracterización (Řezanka et al., 2018).

Considerando el novedoso potencial químico presentado por la cepa fúngica antártica *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, este Seminario de Título emprende la búsqueda de clusters génicos biosintéticos de sideróforos y la caracterización química de estos compuestos producidos por esta cepa antártica.

### **Identificación y análisis de genes codificantes de enzimas NRPSs sideróforas y otros genes posiblemente implicados en la biosíntesis de estos compuestos**

Los sideróforos fúngicos son biosintetizados en rutas complejas que involucran la formación de enlaces peptídicos por la acción de NRPSs (Schwecke et al., 2006). Dada la estructura modular de estas enzimas, es posible realizar análisis *in-silico* mediante softwares bioinformáticos entrenados (Medema et al., 2011) y obtener información sobre los MS producidos por ellas.

En el genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, se identificaron 8 potenciales clústers conteniendo NRPSs como enzimas principales (Tabla 4). De todos ellos, sólo dos evidenciaron la presencia de NRPSs potencialmente implicadas en el metabolismo de biosíntesis de sideróforos. La primera fue denominada GymA mientras

la otra correspondía a GymE, aquella que fue preliminarmente detectada mediante el análisis de un fragmento de su secuencia nucleotídica.

GymA presentó altos porcentajes de identidad con NRPSs sideróforas, encontrándose un 89.40% con la secuencia codificante de una NRPS de *P. verrucosus*. Posiblemente este gen codifique para una NRPS siderófora presente en un cluster biosintético implicado en la producción de ferricromo en *P. verrucosus* y *P. destructans* (Palmer et al., 2018).

Actualmente, las NRPSs involucradas en la biosíntesis de sideróforos de tipo ferricromo se han agrupado en 6 clases (Tabla 10). Las NRPSs contenidas en estas 6 clases diferentes presentan diferencias en la cantidad y organización de los módulos de adenilación (A), portador de grupos peptidil (P) y condensación (C) (Schwecke et al., 2006). La estructura modular de GymA, identificada por los softwares asociados a antiSMASH, mostró que contaba con la siguiente secuencia de módulos: P-A-C-P-C-C, la cual no presenta una estructura similar a ninguna de las seis clases definidas para NRPSs sintetizadoras de ferricromos (Tabla 10). De igual forma, los dominios presentes en las NRPSs implicadas en la biosíntesis de ferricromo tanto de *P. verrucosus* como de *P. destructans* (datos no mostrados) son diferentes a los detectados en GymA y tampoco caben dentro de las clases descritas como productoras de ferricromos (Tabla 10).

**Tabla 10.** Clases de NRPSs involucradas en la biosíntesis de sideróforos de tipo ferricromos. Se describe la organización modular que las caracteriza y proporcionan ejemplos de organismos fúngicos donde se han descrito.

Clase	Organización	Ejemplos
I	APCAPAPCPC*	<i>Ustilago maydis</i> (sid2) [O43103]
II	APCAPAPCPCPC	<i>Aspergillus nidulans</i> (sidC) [AAP56239],

		<i>Aspergillus fumigatus</i> (sidC) [EAL91050]
III	APCPA*PCAPCPCPC	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (sib1) [NP_593102]
IV	APCAPCPCAPCPCPC	<i>Neurospora crassa</i> (nps2) [EAA31066]
V	APCAPCPCAPCPCPC	<i>Bipolaris maydis</i> (nps2) [AAX09984]
VI	APCPCPC	<i>C. cinerea</i> [CC1G04210]

Si bien, el análisis de los dominios presentes en una NRPS podría entregar una guía en la asignación de un posible metabolito con su función, su clasificación realmente no determina la identificación de los sideróforos que podrían producir. De hecho, NRPSs sideróforas con arquitecturas muy similares pueden sintetizar compuestos muy distintos. Por ejemplo, las ferricromo sintetisas tipo II, que pertenecen al linaje NPS1/SidC, biosintetizan ferricrocina en *A. fumigatus* y *A. nidulans*, mientras que malonicromo en *F. graminearum* y ferricromo A en *O. olearius*. Como caso contrario, también se ha descrito que un mismo sideróforo puede ser sintetizado por dos NRPS diferentes. Así, el ferricromo es sintetizado por SidC en *A. niger* y por Sib1 en *Schizosaccharomyces pombe*, que no presentan linaje en común (Bushley et al., 2008; Le Govic et al., 2019).

Por otro lado, los genes codificantes de NRPSs han sido descritos como una clase génica que evoluciona con gran rapidez, generando que haya poca identificación de ortólogos entre especies y distribuciones poco comparables y generalizables (Bushley & Turgeon, 2010). Por lo tanto, aun cuando se tengan datos de NRPS codificadas por secuencias ortólogas con función conocida, no necesariamente esto permitirá esclarecer certeramente su función, naturaleza y metabolito producido. En muchos casos, las NRPSs fúngicas forman parte de clusters metabólicos que incluyen genes

codificantes de enzimas accesorias, las cuales modifican la estructura del núcleo sintetizado por la NRPS, o proteínas implicadas en el transporte tanto de productos intermedios de la ruta como el producto final (Le Govic et al., 2019). Tras los análisis bioinformáticos realizados en este trabajo, se observó que *gymA* se ubicaba en un sitio génico contiguo a un gen que presenta un 51,96% de identidad con una secuencia génica codificante de una L-ornitina N5-oxigenasa, denominada *sidA* (Figura 3). Se ha descrito que la presencia de *sidA* es suficiente para establecer la capacidad productora de sideróforos de tipo hidroxamatos, tanto intracelulares como extracelulares, en un organismo fúngico (Haas, 2014). Considerando que el análisis por antiSMASH arrojó la presencia de un cluster génico para *gymA* que contempla una región génica mucho mayor a lo ocupado por la secuencia génica codificante para una posible SidA, se procedió a buscar otros genes dentro de este cluster que podrían estar implicados en el metabolismo de sideróforos. Ningún otro gen potencialmente implicado en la biosíntesis de los compuestos de interés fue encontrado en la región génica próxima a *gymA*. Analizando el estudio bioinformático de clústers biosintéticos efectuado en diversos organismos del género *Pseudogymnoascus* realizado por Palmer y colaboradores, se evidenció una similitud entre el clúster de *gymA* con un cluster asignado en *P. verrucosus* como posible productor de ferricromo (datos no mostrados) (Palmer et al., 2018). La similitud se da en términos de las posibles funciones encontradas también en el cluster *S. apiospermun* (Le Govic et al., 2019), es decir, *gymA*, la secuencia asociada a *sidA*, y los otros 9 ORF ubicados en la misma posición y con las mismas posibles funciones, no relacionadas con el metabolismo de sideróforos, en *P. verrucosus* y *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB. Por lo tanto, de acuerdo con esta evidencia expuesta, se propone que GymA estaría

implicada en la biosíntesis de sideróforos intracelulares, los que posiblemente podrían corresponder a la familia de los ferricromos.

Realizando un análisis similar respecto a GymE, se encontró que posee un 99.52% de identidad con una NRPS de *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13 de función desconocida y un 92,47% de identidad con la NPS6 de *P. destructans* (Tabla 3). En su estudio bioinformático del género *Pseudogymnoascus*, Palmer y colaboradores también reportaron la presencia de una NRPS siderófora en *Pseudogymnoascussp. 24MN13*, la que estaría formando parte de un cluster biosintético potencialmente involucrado en la biosíntesis de fusarinina C, un sideróforo extracelular y precursor de la TAFC (Palmer et al., 2018). En este punto recordar que, como se comentó previamente, ha sido demostrada la producción de TAFC por *P. destructans*. Por tanto, se ha comprobado experimentalmente la producción de este tipo de sideróforos por partes de cepas del género *Pseudogymnoascus*.

En términos de los módulos y linajes de las NRPS de sideróforos extracelulares, existen dos linajes de NRPSs que producen este tipo de sideróforos; las NRPSs ortólogas de SidD, que producen sideróforos del tipo fusarininas, y las NRPS de tipo NPS6 que producen sideroforos del tipo coprogeno (Hai et al., 2020). Estas NRPSs presentan diferencias respecto a su organización modular; para SidD corresponde a A-P-C-dA-P-C, siendo dA un dominio de adenilación degenerado, mientras que para las NSP6 es A-P-C-dA-P-P-C (Hai et al., 2020). Considerando la organización modular predicha para GymE, A-P-C-P-C (Tabla 4), es posible establecer que es similar a las NRPSs de tipo SidD, las que están implicadas en la biosíntesis de fusarininas.

Como se indicó anteriormente, es de destacar que la estructura precisa de un MS no puede ser predicha solo por la secuencia de la NRPS involucrada en su biosíntesis. Por ejemplo, aun cuando la proteína SidD de *A. fumigatus* y *A. niger* presentan cerca

de un 66% de identidad entre sí, *A. fumigatus* produce fusarinina C mientras que *A. niger*, coprogeno B. Incluso, curiosamente, se ha visto que uno de los ortólogos más cercanos de SidD de *A. fumigatus*, se encuentra en un organismo que no pertenece al género fúngico *Aspergillus* (Le Govic et al., 2018). Por tanto, para contar con información bioinformática más robusta, se estudió el entorno génico de *gymE* identificado mediante antiSMASH. Así, se identificaron 15 ORFs de los cuáles sólo 4 presentaron altos porcentajes de identidad con secuencias codificantes cuyos productos génicos estarían implicados en el metabolismo de sideróforos, siendo estos: *sidJ*, *sidF*, *sidH* y *sitT* (Tabla 7).

En los organismos del género *Aspergillus*, se ha establecido que SidJ corresponde a una esterasa específica para la hidrólisis de fusarinina C, encontrándose altamente conservada en los organismos fúngicos en general (Gründlinger et al., 2013). Particularmente, después de la incorporación del complejo fusarinina C-  $\text{Fe}^{+3}$  al interior celular, SidJ favorece la degradación del compuesto sideróforo, bajando su afinidad por el ión férrico permitiendo la captación del metal por los sideróforos intracelulares (Ecker et al., 2018). Por otro lado, SidF, corresponde a una acetil transferasa, encontrada en todos los organismos fúngicos productores de sideróforos de tipo hidroxamato (Khan et al., 2018). Particularmente, se ha comprobado que SidF en *T. marneffeii* actúa formando anhidromevalonil-hidroxiornitina, a partir del precursor N5-hidroxiornitina, en la ruta de biosíntesis del sideróforo extracelular coprogeno B (Pasricha et al., 2016). Por su parte, SitT es un transportador perteneciente a la familia de transportadores tipo ABC, los cuales han sido encontrados en diversos organismos fúngicos (*A. nidulans*, *A. fumigatus*, entre otros) cumpliendo el rol de transportadores de sideróforos (Haas, 2014). Particularmente, en *A. fumigatus* se estableció que SitT efectúa el transporte de complejos xenosideroforo- $\text{Fe}^{+3}$  al interior celular (Lu et al., 2019). Finalmente, SidH

cumple un rol clave en la formación del mevalonil-CoA que es necesario para la biosíntesis de sideróforos extracelulares (Haas, 2014).

Sorpresivamente, al aplicar la segunda estrategia de búsqueda de genes implicados en la producción, regulación y transporte de sideróforos, con la cual se pretendía encontrar genes de la biosíntesis de sideróforos en otras regiones génicas no analizadas, se identificó una secuencia dentro del cluster de *GymE* que presentó un alto porcentaje de identidad con *mirB* (Tabla 8). *MirB*, pertenece a la familia de transportadores MFS y actúa específicamente para el transporte al interior celular de sideróforos TAFC (Haas, 2014), compartiendo con los otros genes del cluster la posibilidad de presentar un rol relacionado al metabolismo de sideróforos extracelulares de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB.

Si bien en diversas especies fúngicas se han encontrado genes implicados en el metabolismo de sideróforos constituyendo clústers génicos, el número de clústers y el contenido de éstos puede variar considerablemente (Haas, 2014). De hecho, genes codificantes de actividades relevantes en el metabolismo de los sideróforos; por ejemplo, *sidI*, suelen no ubicarse dentro de clusters, aunque esto varía entre los diversos organismos (Haas, 2014). Debido a esto y tal como se comentó previamente, se utilizó la información respecto a genes caracterizados en la biosíntesis de sideróforos, en el modelo *A. fumigatus* y en la especie de *Pseudogymnoascus* más estudiada, *P. destructans*, para la búsqueda de genes del metabolismo de sideróforos distribuidos en otras regiones del genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB. Dentro de los genes encontrados, que no formaban parte de los clusters génicos descritos, es decir los clusters de *gymA* y *gymE* (Tabla 8 y 9), se encuentran: a) *sidG*, b) *sidL*, c) *sidI*, d) *pacC*, e) *hapX*, f) *ace1*, g) *agaA*, h) *mpkA*, i) *fso1*, j) *mirD*, k)

*sit1* y l) *mirB*. En la Tabla 11 se puede visualizar un resumen sobre las funciones conocidas a los productos génicos de dichos genes.

**Tabla 11.** Resumen posibles funciones de secuencias génicas que no formaban parte de los clusters génicos descritos

Gen	Función	Paso o metabolismo implicado
<i>sidG</i>	Transacetilasa	Triple N2-acetilación de la fusarinina C para la formación de TAFC
<i>sidL</i>	Transacetilasa	Producción de ferricrocina
<i>sidI</i>	Transportador sideróforos	Ligación entre el mevalonato y la coenzima A para la obtención de anhidromevalonil-CoA,
<i>pacC</i>	Activador de la expresión génica	Activa la expresión de genes dependientes de condiciones alcalinas y reprime aquellos que dependen de condiciones ácidas
<i>hapX</i>	Factor de transcripción Cis2His2	Regulación de la expresión de genes ligados a la deficiencia de hierro
<i>sreA</i>	Factor de transcripción bZip	
<i>mpkA</i>	Map quinasa A	Activada por la deficiencia de hierro y activa expresión de genes de sideróforos
<i>agaA</i>	Arginasa	Conversión de arginina a ornitina
<i>mirB</i>	Transportador MFS	Transportador de TAFC
<i>mirD</i>	Transportador MFS	Desconocida
<i>sit1</i>	Transportador sideróforos	Característico en el transporte de sideróforos en <i>S. cerevisiae</i> . En <i>A. fumigatus</i> , transporte de ferricromo A y algunos coprogenos, y en la utilización de ferricromo, ferricrocina y ferricrosina
<i>fso1</i>	acil-transferasa	Biosíntesis de TAFC
<i>ace1</i>	acil-transferasa	Desconocida

Respecto a SidG, se ha descrito que su actividad es requerida para la biosíntesis de TAFC, pero no para la de fusarinina C, coprogenos o ferricromos. No son muchas las especies fúngicas que poseen este gen, y sólo está presente en aquellas especies que producen TAFC (Haas, 2014). La secuencia génica de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB presentó un 64,02% de identidad *sidG* de *Aspergillus arachidicola* (Tabla 9), por lo que la asociación entre este gen con la con la función realizada por SidG no es particularmente robusta.

Otro de los genes identificados en el genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB mostró un 56,27% de identidad con *sidL*, que codifica para una N(6)-hidroxilisina O-acetiltransferasa de *Lachnellula hialina*. Particularmente, la inactivación de SidL en *A. fumigatus*, en condiciones de deficiencia de hierro, disminuye la producción de ferricrocina mientras que, en condiciones de suficiencia de hierro, la bloquea completamente. Además, SidL se expresa constitutivamente, es necesaria para la biosíntesis de ferricrocina, un sideróforo intracelular y no suele encontrarse dentro de clusters biosintéticos de sideróforos (Blatzer et al., 2011). Esta última característica sería concordante con nuestro resultado.

Siguiendo con las potenciales funciones de los genes identificados, relevantemente ha sido establecido que SidL es esencial para la biosíntesis de sideróforos extracelulares (Haas, 2014).

Por otro lado, en el género fúngico *Aspergillus*, se ha establecido que la regulación en la expresión de ciertos genes es mediada por el factor de transcripción tipo dedos de zinc de amplio dominio, PacC. Se han encontrado secuencias consenso de sitios de unión de PacC en *sidA* y en algunos transportadores de sideróforos, como *mirA* y *mirB* (Trushina et al., 2013). Aun así, se estableció una baja regulación de este sistema respecto a los valores de pH ambiental, indicando efectos independientes de PacC (Eisendle et al., 2004; Trushina et al., 2013).

El gen codificante para HapX se encuentra altamente conservado a nivel de los diversos géneros fúngicos, exceptuando en *S. cerevisiae* y otras levaduras, que presentan otros sistemas de regulación de la expresión de genes ligados a la deficiencia de hierro (Schrettl et al., 2010).. Considerando que SreA, al igual que HapX, son altamente prevalentes en los organismos fúngicos, es posible que esta ausencia

de resultado puede significar que la secuencia codificante para SreA en *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB presenta diferencias importantes respecto a las de otros organismos descritos, dificultando su búsqueda en base a las secuencias de los genes ya caracterizados en éstos organismos, o a que realmente no se encuentra presente y exista otro mecanismo de regulación implicado en este metabolismo.

Mpka, esta quinasa se activa por la deficiencia de hierro y se ha establecido que regula la producción de sideróforos de forma independiente (Jain et al., 2011). Por otro lado, *AgaA*, es una arginasa, lo cual es de suma importancia ya que la ornitina, su producto, es esencial para la biosíntesis de los sideróforos fúngicos de tipo hidroxamato (Dietl et al., 2020).

Así también, se encontraron genes de transporte de la familia MFS: *mirB* y *mirD*. En base a lo expuesto, existiría potencialmente una secuencia posiblemente codificante para MirB dentro del cluster de GymE, en el contig n°6 del genoma de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB y otra presente dentro del contig n°7, ambas con un porcentaje de identidad cercano al 70% con secuencias codificantes para *mirB* (Tabla 8 y 9). Respecto a la secuencia que mostró cerca de un 59% de identidad con otra codificante para MirD (Tabla 9), no es mucho lo que se puede establecer ya que la especificidad de sustrato de este transportador aún sigue siendo desconocida (Misslinger et al., 2021).

Otra secuencia de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB mostró 90,10% de identidad con un gen codificante de un transportador de sideróforos denominado Sit1. Análisis filogenéticos han revelado que todos los Sits presentes en *S. cerevisiae* presentan mayor similitud entre sí que con aquellos presentes en otras especies fúngicas (Aguar et al., 2021). Interesantemente, se demostró que en *A. fumigatus*, que

también mediaría el uso de sideróforos extracelulares de tipo coprogenos, como el coprogeno y el coprogeno B, y no participaría en la utilización de fusarinina C y TAFC, sideróforos extracelulares endógenos de *A. fumigatus* (Aguiar et al., 2021). Esto sería concordante con la posible función de otras secuencias encontradas en *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, implicadas en el metabolismo de sideróforos intracelulares, principalmente de tipo ferricromos, y extracelulares, de tipo fusarininas o coprogenos.

Finalmente, se encontraron secuencias con altos porcentajes de identidad con *fso1* y *ace1*. Ha sido reportado que la expresión de Fso1 se ve aumentada en condiciones de deficiencia de hierro (Welzel et al., 2005). Ante la posibilidad de encontrar una segunda NRPS implicada en el metabolismo de sideróforos intracelulares en *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, se analizó la secuencia de la hipotética Fso1 mediante BLAST, encontrándose que los dominios potencialmente presentes no corresponden a los asociados a la estructura de las NRPSs. Por el contrario, se hallaron dominios tipo WW y PhoD (datos no mostrados), asociados a la unión de polipéptidos ricos en prolina y de coordinación de metales (manganeso, hierro o zinc), respectivamente. La identificación *in silico* de este gen en *Pseudogymnoascus destructans*, sugirió la función de acil-transferasas potencialmente implicada en la biosíntesis de TAFC (Mascuch et al., 2015). En este mismo estudio, Ace1 se definió como una posible acil-transferasa, al igual que Fso1.

En resumen, todo el análisis bioinformático efectuado sugiere que *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB presenta genes implicados en la producción de sideróforos de tipo hidroxamatos. En concreto, presenta genes potencialmente implicados en el metabolismo de sideróforos intracelulares de la familia de los ferricromos. Estos genes se localizan principalmente en el cluster *gymA*, y también en otras regiones génicas

como son aquellos genes con similitud a *sidL* y *sit1*. De igual forma, el análisis sugiere que *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB posee secuencias génicas implicadas en el metabolismo de sideróforos extracelulares, principalmente del tipo fusarininas y, en menos grado de probabilidad, de tipo coprogeno. Estas secuencias se agrupan en el cluster de *gymE*, y también se ubican en otras regiones del genoma, como son aquellas secuencias con similitud con *sidF*, *sidH*, *sidI*, *sidJ*, *sidG* y *mirB*, siendo este último encontrado posiblemente en dos regiones génicas diferentes.

### **Estudio de la producción de compuestos sideróforos y su conexión con el potencial genético identificado en *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB**

La producción de compuestos sideróforos, al igual que la de muchos otros MS, se ve altamente influenciada por las condiciones de cultivo. Por lo tanto, aun cuando los análisis bioinformáticos indiquen la capacidad genética de poder formar estos compuestos, es esencial establecer un conjunto de condiciones de cultivo que realmente induzca su producción (Macheleidt et al., 2016).

Tal como se ha comentado previamente, el factor de mayor relevancia en términos de la regulación de la producción de compuestos sideróforos por parte de los organismos fúngicos, corresponde a la concentración de hierro biodisponible para su utilización. Las distintas especies de organismos presentan diferentes valores de concentración de hierro suficiente para la inhibición de este sistema de captación, encontrándose un rango entre 3- 27 $\mu$ M. Dentro este, la gran parte de las especies fúngicas de los géneros *Aspergillus* , *Penicillium* e incluso de otros géneros, tales como *Rhizopus*, mostraron una producción de sideróforos inhibida con concentraciones de hierro añadido menores a 21  $\mu$ M (Dave & Dubc, 2000).

Teniendo esto en consideración, se utilizaron dos medios mínimos de crecimiento habituales en hongos, M9 y Czapeck, para facilitar el control de las trazas de hierro presentes en los diversos constituyentes de los posibles medios. La formulación del medio Czapeck se hizo con dos versiones; una con 36  $\mu\text{M}$  de hierro, concentración propia de su formulación, y otra sin la adición de hierro. De los tres medios de cultivo evaluados, el ensayo CAS evidenció que sólo el medio M9 demostró promover una producción sustancial de compuestos sideróforos (Figura 6).

Al analizar la Figura 6, se puede observar que el porcentaje de decoloración del medio M9 a tiempo cero presentó un valor cercano al 70%, indicando presencia de sideróforos en el medio estéril. Dado el uso de preinóculos de 3 días de cultivo podemos establecer que ya hay producción de sideróforo a esa cantidad de días de cultivo.

Por otro lado, la mejor producción de sideróforos en el medio M9 ya que el medio M9 fue diseñado para inducir la producción de sideróforos en organismos bacterianos y fúngicos, función para la cual es ampliamente utilizado (Bosello et al., 2013; Murugappan et al., 2012). La formulación del medio M9, contempla como fuente de carbono la glucosa (Bosello et al., 2013), pero con el fin de asimilarla lo más posible a la formulación del medio Czapeck, medio en el que nuestra cepa crecía correctamente, se usó sacarosa como fuente de carbono. Este cambio en la fuente de carbono además está fundamentado por lo descrito en la bibliografía ya que, en un estudio sobre la relación de la producción de sideróforos fúngicos con la fuente de carbono del medio de cultivo en distintas especies fúngicas, la utilización de sacarosa indujo un alto nivel de producción de sideróforos (Aziz et al., 2016). Por lo tanto, la utilización de sacarosa como fuente de carbono en las fermentaciones de *Pseudogymnoascus* sp.

131209-E2A-C5II-EB probablemente favoreció la producción de compuestos sideróforos.

Muchos de los clusters de biosíntesis de MSs permanecen sin expresarse en las condiciones de cultivo del laboratorio, imposibilitando entonces la detección del MS que producen. Para lograr la activación de estos clusters génicos, denominados silentes, es necesario evaluar como la formación de estos compuestos se ve regulada y afectada por distintos parámetros, tales como: reguladores de expresión génica globales o locales, co-cultivos de microorganismos y condiciones fisicoquímicas del ambiente de cultivo.

Según lo investigado hasta ahora, la influencia de otros componentes del medio de cultivo, por ejemplo, la fuente de nitrógeno o la concentración de electrolitos en la producción de sideróforos (Aziz et al., 2016) es muchísimo menor en comparación a la presencia de hierro externo en el medio de cultivo. Por lo tanto, cuidar de forma estricta el aporte de trazas de hierro de los diferentes componentes del medio a utilizar es de gran importancia. Así, con el fin de minimizar los aportes no controlados a la concentración de hierro presente en el medio de fermentación, es frecuente que en los protocolos de cultivo para la producción de sideróforos se utilicen estrategias como la adición de un agente quelante, como la 8-hidroxiquinolina o el  $\alpha$ ,  $\alpha$ -dipiridil, para remover las trazas de hierro presentes en los medios de cultivo (Vala et al., 2006), y también el lavado de todo el material de vidrio utilizado con una solución acuosa de HCl 6M .

Una vez que se comprobó la producción de compuesto sideróforos en determinadas condiciones de cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB, se procedió a estudiar la relación entre esta producción con la expresión de la GymE, potencialmente una NRPS siderófora de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB. Para ello, y, en

primer lugar, se analizó la influencia de una concentración de hierro externa en la producción sideróforos extracelulares (Figura 8) y la expresión de *GymE* (Figura 9).

La expresión de *GymE*, la NRPS potencialmente implicada en la biosíntesis de los sideróforos extracelulares (Figura 9), se observa en los días 5 y 8 de cultivo, siendo más débil en este último día. Esto podría ser a causa del ciclo de vida de este organismo fúngico, en concreto estaría relacionado con la duración de la fase estacionaria, ya que, si el día 8 se encuentra más cercano al final de esta fase, es posible que exista un alto nivel de degradación de los ARN mensajeros. Para corroborar esto se debe efectuar una curva de crecimiento en condiciones de inducción de producción de sideróforos y realizar a distintos tiempos una RT-PCR en tiempo real que permita evaluar cuantitativamente los niveles de expresión de este gen durante toda la fermentación.

Dado que las condiciones de fermentación en las que se pudo observar la expresión de *gymE* se correlacionan con aquellas en que los ensayos de detección de sideróforos colorimétricos, ensayo CAS y de cloruro férrico, son positivas, es muy probable que *GymE* sea una NRPS implicada en el metabolismo de sideróforos extracelulares. Adicionalmente, de este experimento se pudo extraer una información adicional relacionada con la estructura de los sideróforos. Dado que el color del ensayo colorimétrico del cloruro férrico presentaba una tonalidad vino, es posible que los sideróforos extracelulares producidos por nuestro organismo de interés sean de tipo hidroxamato (Vala et al., 2006). La producción de este tipo de sideróforos es esperable, ya que aun cuando se han encontrado organismos fúngicos capaces de producir sideróforos de tipo carboxilato (*Mucorales*) y catecolato (Holinsworth & Martin, 2009), estas son excepciones, y los sideróforos de tipo hidroxamato son la principal clase de sideróforos encontrados en hongos. Sin embargo, este resultado no es concluyente ya

que los ensayos colorimétricos nos pueden orientar sobre el tipo de estructura del sideróforo, pero este no se puede determinar hasta que la realización de estudios espectroscópicos.

### **Purificación de compuestos sideróforos producidos por *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB**

La gran mayoría de los organismos fúngicos producen un variado número de compuestos sideróforos, los cuales pueden, incluso, pertenecer a clases distintas. Debido a esto, la realización de procesos eficientes de extracción y purificación supone un paso clave para la caracterización de potenciales nuevos compuestos (Jalal & Van Der Helm, 2017).

La realización de una cromatografía en capa fina (CCF) con el extracto de un cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB en condiciones de producción de compuestos sideróforos nos permitió establecer la presencia al menos 2 posibles clases de compuestos sideróforos distintas; hidroxamatos, asociados a la presencia de compuestos que con una solución de cloruro férrico revelan un color vino y catecolatos, asociados a la presencia de compuestos que revelan un color naranja al reaccionar con la solución de cloruro férrico. Información más específica sobre los sideróforos presentes no puede ser extraída de este experimento (Memon, 2005). Además, pese a que se logró una buena separación de los compuestos presentes, no fue posible realizar una purificación de los sideróforos desde una placa de silica gel preparativa. Ello debido a que, al eluirse los compuestos adheridos a la silica, se observó una gran diversidad de compuestos lo que se asocia a un proceso de degradación.

Posteriormente, empleando la técnica de HPLC se consiguió determinar cuáles compuestos podían ser potenciales sideróforos al evaluar su presencia o ausencia en cultivos con y sin hierro. Comparando las muestras de caldos de cultivo de 5 y 8 días (Figura 11 y 12, respectivamente), se logró determinar la presencia de cuatro posibles compuestos sideróforos (Tabla 9). Adicionalmente, al considerar la intensidad en la absorbancia de estos compuestos se pudo determinar que los cultivos de 8 días poseían una mayor concentración de compuestos potencialmente sideróforos.

Por otro lado, ha sido establecido que el tratamiento con compuestos férricos, principalmente cloruro férrico, de las muestras que contienen potenciales compuestos sideróforos, aumenta considerablemente su estabilidad química, favoreciendo los posteriores procesos de purificación e identificación (Jalal & Van Der Helm, 2017). Respecto a esto, en este trabajo se demostró que efectuar el tratamiento de quelación con 5 mL de una solución acuosa 1% de  $\text{FeCl}_3$  por cada 1 mL de caldo de cultivo, era más efectivo que el uso de una menor cantidad (Figura 14). Adicionalmente se observó que los compuestos 1 (RT 7,362) y 2 (RT8,094), compuestos con máximos de absorbancia a 485 nm, y por tanto posibles sideróforos de tipo catecolatos (Dave & Dube, 2000), veían muy afectada su concentración por el uso de las distintas cantidades de  $\text{FeCl}_3$ . Por el contrario, la concentración de los compuestos 3 y 4, los cuales poseen máximos de absorción a 440 nm, y por tanto son posiblemente sideróforos de tipo hidroxamato, no se vio afectada por el uso de distintas cantidades de  $\text{FeCl}_3$  (Dave & Dube, 2000). El análisis de estos resultados sugiere que los iones  $\text{Fe}^{+3}$  disponibles son captados con distinta afinidad por los diferentes tipos de sideróforos encontrados, siendo más afines los de tipo hidroxamato. Lo que se conoce a este respecto hasta el momento es que los sideróforos de tipo catecolatos poseen

gran afinidad por el ión férrico debido a la acción de dos orto-fenolatos con una gran densidad de carga (Khan et al., 2018). En el caso de los hidroxamatos, se observa una gran densidad de carga en el oxígeno del grupo carbonilo, la cual se deslocaliza hacia las cadenas laterales, aumentando la densidad electrónica del átomo de oxígeno y la afinidad por el  $\text{Fe}^{+3}$ . Además, la denticidad y ciclación del compuesto juega un rol clave en la afinidad por  $\text{Fe}^{+3}$ , estableciéndose que los ligandos hexadentados y la ciclación de los compuestos determina una mayor afinidad por el hierro (Hider & Kong, 2010; Khan et al., 2018). Debido a esto, puede ser que los compuestos 1 y 2 presenten distinta denticidad o arquitectura, en términos de la ciclación, que los compuestos 3 y 4. En cualquier caso, la posibilidad de que ciertos compuestos sideróforos producidos por nuestro organismo de estudio pudiesen ser catecolatos resulta extremadamente inusual e interesante, ya que esta clase de sideróforos se asocia más a organismos bacterianos que fúngicos (Khan et al., 2018).

De todos modos, dado que el análisis bioinformático entregó grandes indicios sobre la capacidad de producción de hidroxamatos por parte de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB y que la potencial ruta biosíntesis de catecolatos en organismos fúngicos aún no es descrita, la producción y estabilidad de compuestos sideróforos de tipo catecolato es un resultado difícil de analizar. Para ello se requiere, en primera instancia, determinar la estructura química de los sideróforos potenciales detectados y comprobar que efectivamente los compuestos 1 y 2 corresponden a sideróforos de tipo catecolatos.

Durante el proceso de aislamiento, solo tres de los cuatro compuestos identificados como sideróforos, se pudieron aislar efectivamente. En particular, el compuesto 2 se perdió durante el proceso de purificación. Esto pudo deberse a su degradación, lo que es un proceso usualmente reportado en los protocolos de purificación de sideróforos

(Jalal & Van Der Helm, 2017). Finalmente, el análisis de espectrometría de masas de las fracciones correspondientes a los compuestos 1, 3 y 4, mostraron que existían cuatro posibles candidatos de compuestos sideróforos (Tabla 9), al determinarse la presencia del cluster isotópico del hierro de cuatro compuestos. Al comparar las masas de alta resolución de estos cuatro candidatos (Tabla 9) con las de los sideróforos descritos hasta la fecha (Pluháček, T et al., 2016), se comprobó que no había ninguna correspondencia, sugiriendo que todos ellos serían compuestos sideróforos no descritos previamente.

Considerando los resultados de los análisis bioinformáticos y los ensayos colorimétricos, se creía muy posible encontrar TAFC entre los candidatos. Este sideróforo presenta una masa, en términos de su estructura quelada con hierro, de 911.8 m/z, la cual no se observó en el espectro de masas de alta resolución de ninguno de los compuestos purificados (Tabla 9). Esto puede significar que: 1) la TAFC se encuentra entre los sideróforos que *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB produce, pero las condiciones de cultivo y/o aislamiento de los sideróforos utilizadas han afectado a su producción y/o detección o 2) *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB no produce TAFC, sino un compuesto de la misma familia, pero con distinta estructura. Entre estas posibles explicaciones, se cree más probable la segunda, ya que, si produjera fusarinina C o TAFC, en principio lo deberíamos haber visto en el análisis de masas de alta resolución, y no se encontró ningún indicio, incluso, de la posible degradación de estos compuestos.

Por otro lado, en términos de los resultados preliminares de los posibles sideróforos producidos por la ruta de biosíntesis de GymA, se pueden hipotetizar dos situaciones: 1) *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB produce ferricromo pero no se encontró su masa porque al ser un sideróforo intracelular, se requiere otro proceso de

producción y purificación o 2) *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB produce algún otro compuesto, de la familia de los ferricromos, como sideróforo intracelular. A la luz de los resultados bioinformáticos obtenidos, será necesario considerar un análisis particular de los sideróforos intracelulares producidos por nuestro organismo de interés.

En resumen, aun es necesario realizar más estudios para identificar los sideróforos producidos por *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB y determinar cuáles son las rutas de biosíntesis implicadas en cada uno de ellos, pero este trabajo supone un gran avance proponiendo potenciales genes implicados y 4 candidatos de compuestos sideróforos.

## CONCLUSIONES

1.- En el genoma del aislado antártico *Pseudogymnoascus* sp 131209-E2A-C5II-EB, se identificaron dos genes codificantes para NRPSs potencialmente implicadas en la biosíntesis de sideróforos: *gymA* y *gymE*.

2.- *gymA* se ubica en la misma región génica que *sidA*, organizándose así un potencial clúster para la biosíntesis de sideróforos intracelulares que presenta similitud con el cluster de ferricrocina de *S. apiospermum* y con el cluster de ferricromo de *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13, indicando así la posibilidad de corresponder a un cluster de algún compuesto de la familia de los ferricromos.

3.- *gymE* se ubica en la misma región génica que *sidF*, *sidH*, *mirB*, *sitT* y *sidJ*, organizándose en un potencial cluster de biosíntesis de sideróforos extracelulares, de arquitectura similar a uno presente en *Pseudogymnoascus* sp. 24MN13, el cual se asocia a la producción de fusarinina C. Ello sugiere que el cluster de *gymE* pueda estar asociado a la producción de un sideróforo de la familia de las fusarininas.

4.- En condiciones de cultivo deficientes en hierro, se consiguió inducir la expresión del gen *gymE*. Esta expresión se correlacionó con la presencia de compuestos sideróforos de tipo hidroxamato en el medio de cultivo.

5.-Se purificaron 4 compuestos de naturaleza siderófora con masas de alta resolución de: m/z 640,2020, m/z 430,9125, m/z 566,8868 y m/z 928,3112. Ninguno de ellos se encuentra registrado en las bases de datos por lo que constituyen potenciales nuevos sideróforos de origen fúngico.

## REFERENCIAS

- Aarts MG, Hodge R, Kalantidis K, Florack D, Wilson ZA, Mulligan BJ, Stiekema WJ, Scott R, P. A. (1997). The Plant Journal - 2003 - Aarts - The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation.pdf. *Plant J.*, 12(3), 615–623. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.00615.x>
- Aguiar, M., Orasch, T., Misslinger, M., Dietl, A. M., Gsaller, F., & Haas, H. (2021). The siderophore transporters sit1 and sit2 are essential for utilization of ferrichrome-, ferrioxamine- and coprogen-type siderophores in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 7(9), 1–16. <https://doi.org/10.3390/jof7090768>
- Albarano, L., Esposito, R., Ruocco, N., & Costantini, M. (2020). Genome mining as new challenge in natural products discovery. *Marine Drugs*, 18(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/md18040199>
- Aziz, O. A. A., Helal, G. A., Galal, Y. G. M., Kader, A., & Rofaida, S. (2016). Fungal Siderophores Production in Vitro as Affected by Some Abiotic Factors. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 210–222. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.025>
- Bhardwaj, S., Singh, S., & Bhatia, S. (2021). Contrasting Role of Fungal Siderophore in Metal Ion Complex Formation. In *Fungal siderophores* (pp. 99–117). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-53077-8>
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2017). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *The Fungal Kingdom*, 1087–1119. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch54>
- Blatzer, M., Schrettl, M., Sarg, B., Lindner, H. H., Pfaller, K., & Haas, H. (2011). SidL, an *Aspergillus fumigatus* transacetylase involved in biosynthesis of the siderophores ferricrocin and hydroxyferricrocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(14), 4959–4966. <https://doi.org/10.1128/AEM.00182-11>
- Bloudoff, K., & Schmeing, T. M. (2017). Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1865(11), 1587–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.05.010>
- Bosello, M., Zeyadi, M., Kraas, F. I., Linne, U., Xie, X., & Marahiel, M. A. (2013). Structural characterization of the heterobactin siderophores from *Rhodococcus erythropolis* PR4 and elucidation of their biosynthetic machinery. *Journal of Natural Products*, 76(12), 2282–2290. <https://doi.org/10.1021/np4006579>
- Bushley, K. E., Ripoll, D. R., & Turgeon, B. G. (2008). Module evolution and substrate specificity of fungal nonribosomal peptide synthetases involved in siderophore biosynthesis. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-328>
- Bushley, K. E., & Turgeon, B. G. (2010). *Phylogenomics reveals subfamilies of fungal nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships*. 1–23.
- Curci, N., Strazzulli, A., De Lise, F., Iacono, R., Maurelli, L., Dal Piaz, F., Cobucci-Ponzano, B., & Moracci, M. (2019). Identification of a novel esterase from the thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Extremophiles*, 23(4), 407–419. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01093-9>
- Dave, B. P., & Dube, H. C. (2000). *Regulation of siderophore production by iron Fe ( III ) in certain fungi and fluorescent pseudomonads*. 38(March), 297–299.
- Dave, B. P., & Dube, H. C. (2000). Chemical characterization of fungal siderophores.

- Indian Journal of Experimental Biology*, 38(1), 56–62.
- de Menezes, G. C. A., Amorim, S. S., Gonçalves, V. N., Godinho, V. M., Simões, J. C., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. (2019). Diversity, distribution, and ecology of fungi in the seasonal snow of antarctica. *Microorganisms*, 7(10), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100445>
- De Serrano, L. O., Camper, A. K., & Richards, A. M. (2016). An overview of siderophores for iron acquisition in microorganisms living in the extreme. *BioMetals*, 29(4), 551–571. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9949-x>
- Dietl, A. M., Binder, U., Bauer, I., Shadkchan, Y., Oshero, N., & Haas, H. (2020). Arginine auxotrophy affects siderophore biosynthesis and attenuates virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Genes*, 11(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/genes11040423>
- Ecker, F., Haas, H., Groll, M., & Huber, E. M. (2018). Iron Scavenging in *Aspergillus* Species: Structural and Biochemical Insights into Fungal Siderophore Esterases. *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(44), 14624–14629. <https://doi.org/10.1002/anie.201807093>
- Eisendle, M., Oberegger, H., Buttinger, R., Illmer, P., & Haas, H. (2004). Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 561–563. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.561-563.2004>
- Fan, D., & Fang, Q. (2021). Siderophores for medical applications: Imaging, sensors, and therapeutics. *International Journal of Pharmaceutics*, 597(January), 120306. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120306>
- Garnerin, T., & Sonnet, P. (n.d.). *Fungal Hydroxamate Siderophores: biosynthesis, chemical synthesis and potential medical applications*. 477–488.
- Ghosh, S. K., Bera, T., & Chakrabarty, A. M. (2020). Microbial siderophore – A boon to agricultural sciences. *Biological Control*, 144(August 2019). <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104214>
- Gluck-Thaler, E., Haridas, S., Binder, M., Grigoriev, I. V., Crous, P. W., Spatafora, J. W., Bushley, K., & Slot, J. C. (2020). The architecture of metabolism maximizes biosynthetic diversity in the largest class of Fungi. *Molecular Biology and Evolution*, 37(10), 2838–2856. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa122>
- Gründlinger, M., Gsaller, F., Schrettl, M., Lindner, H., & Haasa, H. (2013). *Aspergillus fumigatus* SidJ mediates intracellular siderophore hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), 7534–7536. <https://doi.org/10.1128/AEM.01285-13>
- Haas, H. (2014). Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Natural Product Reports*, 31(10), 1266–1276. <https://doi.org/10.1039/c4np00071d>
- Haas, H., Eisendle, M., & Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 149–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338>
- Hai, Y., Jenner, M., & Tang, Y. (2020). Fungal siderophore biosynthesis catalysed by an iterative nonribosomal peptide synthetase. *Chemical Science*, 11(42), 11525–11530. <https://doi.org/10.1039/d0sc03627g>
- Hayen, H., & Volmer, D. A. (2005). Rapid identification of siderophores by combined thin-layer chromatography/matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(5), 711–720. <https://doi.org/10.1002/rcm.1837>
- Hayes, M. A. (2012). The *Geomyces* fungi-Ecology.pdf. *BioScience*, 62(9), 819–823.
- Henríquez, M., Vergara, K., Norambuena, J., Beiza, A., Maza, F., Ubilla, P., Araya, I.,

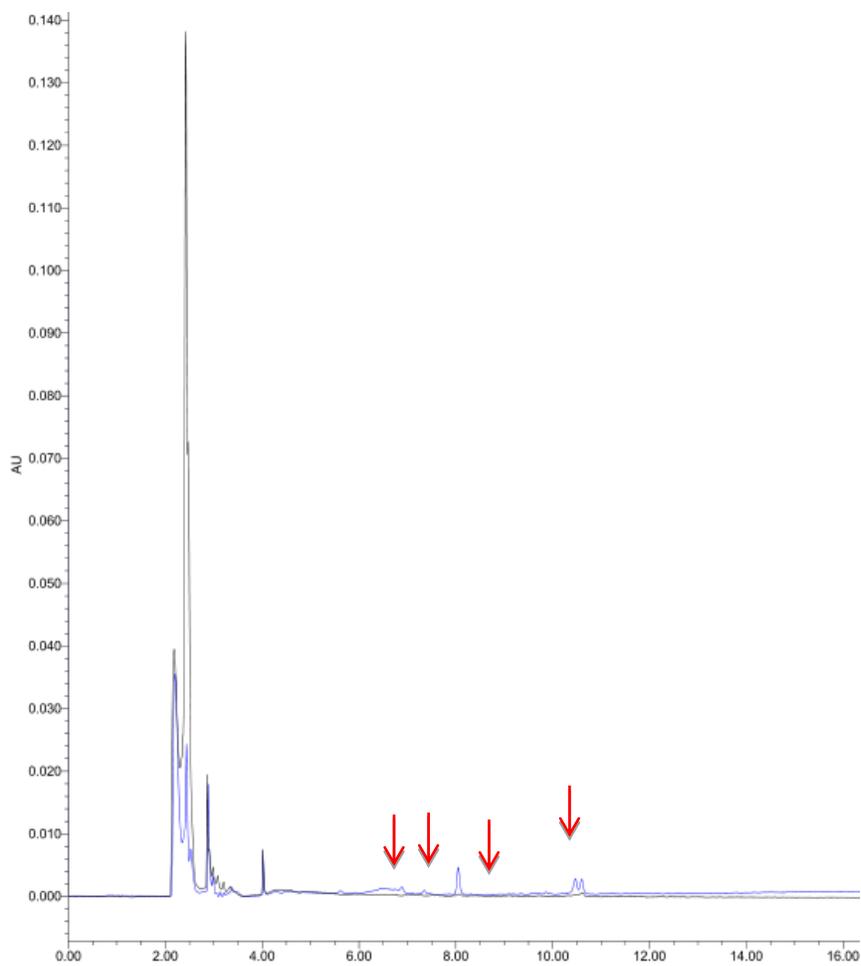
- Chávez, R., San-Martín, A., Darias, J., Darias, M. J., & Vaca, I. (2014). Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(1), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1418-x>
- Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, *27*(5), 637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>
- Holinsworth, B., & Martin, J. D. (2009). Siderophore production by marine-derived fungi. *BioMetals*, *22*(4), 625–632. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9239-y>
- Jain, R., Valiante, V., Remme, N., Docimo, T., Heinekamp, T., Hertweck, C., Gershenzon, J., Haas, H., & Brakhage, A. A. (2011). The MAP kinase MpkA controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology*, *82*(1), 39–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07778.x>
- Jalal, M. A. F., & Van Der Helm, D. (2017). Isolation and spectroscopic identification of fungal siderophores. *Handbook of Microbial Iron Chelates (1991), January 1991*, 235–270. <https://doi.org/10.1201/9780203712368>
- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *43*(2–3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
- Kavitha, K., Suganya, A., Umaa Rani, K., & Ramesh, B. (2017). Screening and Partial Purification of Hydroxamate Type Siderophore from *Pseudomonas* sp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(8), 2380–2385. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.291>
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(3), 167–180. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0121-1>
- Khan, A., Singh, P., & Srivastava, A. (2018). Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review. *Microbiological Research*, *212–213*(August), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>
- Laurie B. Connell, Russell R. Rodriguez, Regina S. Redman, J. J. D. (2014). Cold-adapted yeasts in antarctic deserts. In P. Buzzini & R. Margesin (Eds.), *Springer* (1st ed., pp. 75–98). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6>
- Le Govic, Y., Papon, N., Gal, S. Le, Lelièvre, B., Bouchara, J. P., & Vandeputte, P. (2018). Genomic organization and expression of iron metabolism genes in the emerging pathogenic mold *Scedosporium apiospermum*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00827>
- Le Govic, Y., Papon, N., Le Gal, S., Bouchara, J. P., & Vandeputte, P. (2019). Non-ribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters in the Human Pathogenic Fungus *Scedosporium apiospermum*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(September), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02062>
- Letunic, I., Khedkar, S., & Bork, P. (2021). SMART: Recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D458–D460. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>
- Lu, Y., Liu, G., Jiang, H., Chi, Z., & Chi, Z. (2019). An insight into the iron acquisition and homeostasis in *Aureobasidium melanogenum* HN6.2 strain through genome mining and transcriptome analysis. *Functional and Integrative Genomics*, *19*(1), 137–150. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0633-9>
- Macheleidt, J., Mattern, D. J., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh, V.,

- Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2016). *Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites*. September, 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035203>
- Martín Del Campo, J. S., Vogelaar, N., Tolani, K., Kizjakina, K., Harich, K., & Sobrado, P. (2016). Inhibition of the flavin-dependent monooxygenase siderophore A (SidA) blocks siderophore biosynthesis and aspergillus fumigatus growth. *ACS Chemical Biology*, 11(11), 3035–3042. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00666>
- Mascuch, S. J., Moree, W. J., Hsu, C. C., Turner, G. G., Cheng, T. L., Blehert, D. S., Kilpatrick, A. M., Frick, W. F., Meehan, M. J., Dorrestein, P. C., & Gerwick, L. (2015). Direct detection of fungal siderophores on bats with white-nose syndrome via fluorescence microscopy-guided ambient ionization mass spectrometry. *PLoS ONE*, 10(3), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119668>
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E., & Breitling, R. (2011). AntiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), 339–346. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
- Memon, B. A. (2005). Detection of Siderophores by Thin Layer Chromatography. In *November* (Issue May, p. 4). file:///C:/Users/Gebruiker/Downloads/932-20692-2-PB.pdf
- Misslinger, M., Hortschansky, P., Brakhage, A. A., & Haas, H. (2021). Fungal iron homeostasis with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1868(1), 118885. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118885>
- Murugappan, R. M., Aravinth, A., Rajaroobia, R., Karthikeyan, M., & Alamelu, M. R. (2012). Optimization of MM9 Medium Constituents for Enhancement of Siderophoregenesis in Marine *Pseudomonas putida* Using Response Surface Methodology. *Indian Journal of Microbiology*, 52(3), 433–441. <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0258-y>
- Neilands, B. (1987). *Universal Chemical Assay for the Detection Determination of Siderophores*. 56, 47–56.
- Neilands, J. B. (1981). Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry*, 50, 715–731. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.50.070181.003435>
- Odoh, C. K., Obi, C. J., Francis, A., Unah, U. V., Egbe, K., Akpi, U. K., Lerum, N., & Wanderi, K. (2021). *Extremophilic Fungi and Their Role in Control of Pathogenic Microbes*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-60659-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-60659-6_10)
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., & Turgeon, B. G. (2006). NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell*, 18(10), 2836–2853. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045633>
- Palmer, J. M., Drees, K. P., Foster, J. T., & Lindner, D. L. (2018). Extreme sensitivity to ultraviolet light in the fungal pathogen causing white-nose syndrome of bats. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02441-z>
- Pasricha, S., Schaffner, L., Lindner, H., Joanne Boyce, K., Haas, H., & Andrianopoulos, A. (2016). Differentially regulated high-affinity iron assimilation systems support growth of the various cell types in the dimorphic pathogen *Talaromyces marneffe*. *Molecular Microbiology*, 102(4), 715–737. <https://doi.org/10.1111/mmi.13489>

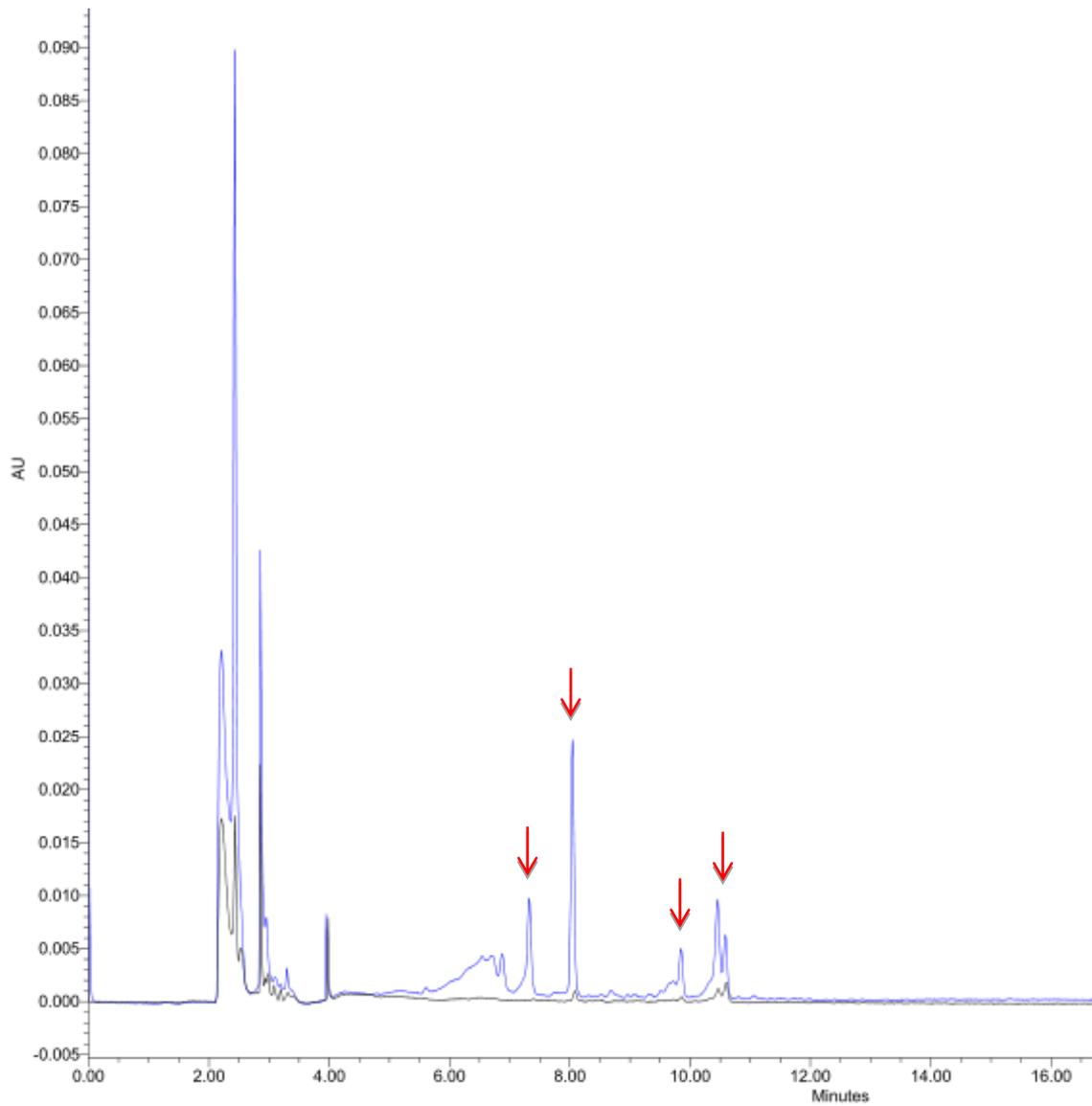
- Pluháček, T., Lemr, K., Ghosh, D., Milde, D., Novák, J., & Havlíček, V. (2016). Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 35(1), 35–47. <https://doi.org/10.1002/mas>
- Pregrado, E. D. E. (2019). “ *Estudio de genes codificantes para enzimas policétido sintasa de la cepa fúngica antártica Vicente Edmundo Oliva Galleguillos* “ *Estudio de genes codificantes para enzimas policétido sintasa de la cepa fúngica antártica Pseudogymnoascus sp 131209*-.
- Retamal-Morales, G., Mehnert, M., Schwabe, R., Tischler, D., Zapata, C., Chávez, R., Schlömann, M., & Levicán, G. (2018). Detection of arsenic-binding siderophores in arsenic-tolerating Actinobacteria by a modified CAS assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157(March), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.087>
- Řezanka, T., Palyzová, A., Faltýsková, H., & Sigler, K. (2018). Siderophores: Amazing Metabolites of Microorganisms. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 60). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64181-6.00005-X>
- Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 3984–3999. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>
- Saleem, M., Shukkoor, A., & Khalivulla, S. I. (2021). *Chemistry and Biomedical Applications of Fungal Siderophores*. Leong 1986.
- Schrettl, M., Beckmann, N., Varga, J., Heinekamp, T., Jacobsen, I. D., Jöchl, C., Moussa, T. A., Wang, S., Gsaller, F., Blatzer, M., Werner, E. R., Niermann, W. C., Brakhage, A. A., & Haas, H. (2010). HapX-Mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001124>
- Schrettl, M., Kim, H. S., Eisendle, M., Kragl, C., Nierman, W. C., Heinekamp, T., Werner, E. R., Jacobsen, I., Illmer, P., Yi, H., Brakhage, A. A., & Haas, H. (2008). *SreA-mediated iron regulation in Aspergillus fumigatus*. 70(August), 27–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06376.x>
- Schwecke, T., Göttling, K., Durek, P., Dueñas, I., Käufer, N. F., Zock-Emmenthal, S., Staub, E., Neuhof, T., Dieckmann, R., & Von Döhren, H. (2006). Nonribosomal peptide synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* and the architectures of ferrichrome-type siderophore synthetases in fungi. *ChemBioChem*, 7(4), 612–622. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500301>
- Storey, E. P., & Chakraborty, D. R. (2005). Isolation, Purification, and Chemical Characterization of the Dihydroxamate-type Siderophore, “Schizokinen,” Produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917. *Department of Health Sciences*, Master of, 108.
- Süssmuth, R. D., & Mainz, A. (2017). Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angewandte Chemie - International Edition*, 56(14), 3770–3821. <https://doi.org/10.1002/anie.201609079>
- Trushina, N., Levin, M., Mukherjee, P. K., & Horwitz, B. A. (2013). PacC and pH-dependent transcriptome of the mycotrophic fungus *Trichoderma virens*. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-138>
- Vala, A. K., Vaidya, S. Y., & Dube, H. C. (2000). Siderophore production by facultative marine fungi. *Indian Journal of Marine Sciences*, 29(4), 339–340.
- Vala, Anjana K., Dave, B. P., & Dube, H. C. (2006). Chemical characterization and quantification of siderophores produced by marine and terrestrial aspergilli.

- Canadian Journal of Microbiology*, 52(6), 603–607. <https://doi.org/10.1139/W06-012>
- Welzel, K., Eisfeld, K., Antelo, L., Anke, T., & Anke, H. (2005). Characterization of the ferrichrome A biosynthetic gene cluster in the homobasidiomycete *Omphalotus olearius*. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.013>
- Xie, X., Wang, J., & Yuan, H. (2006). High-resolution analysis of catechol-type siderophores using polyamide thin layer chromatography. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 390–393. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.022>

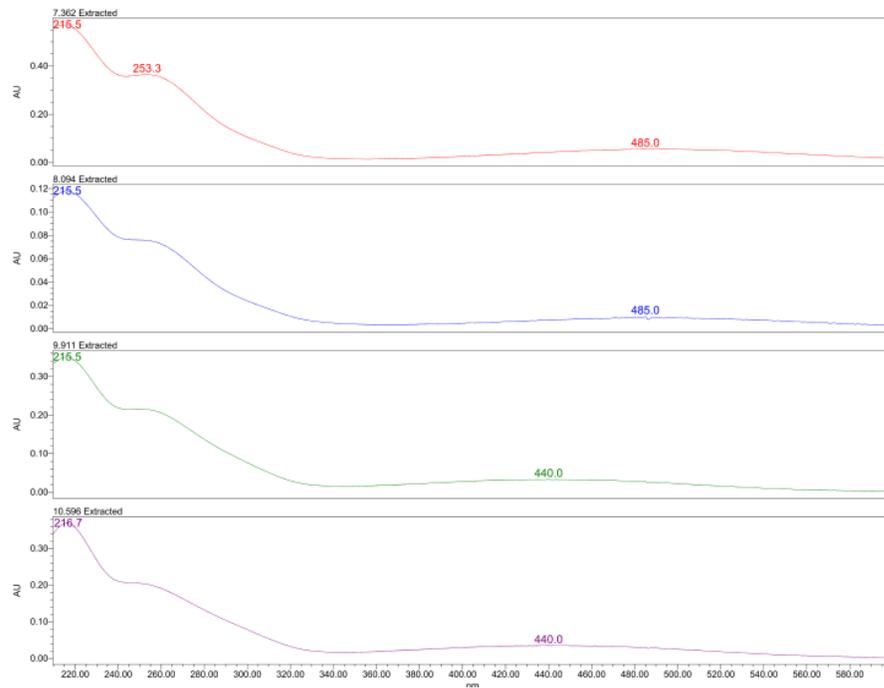
## ANEXO



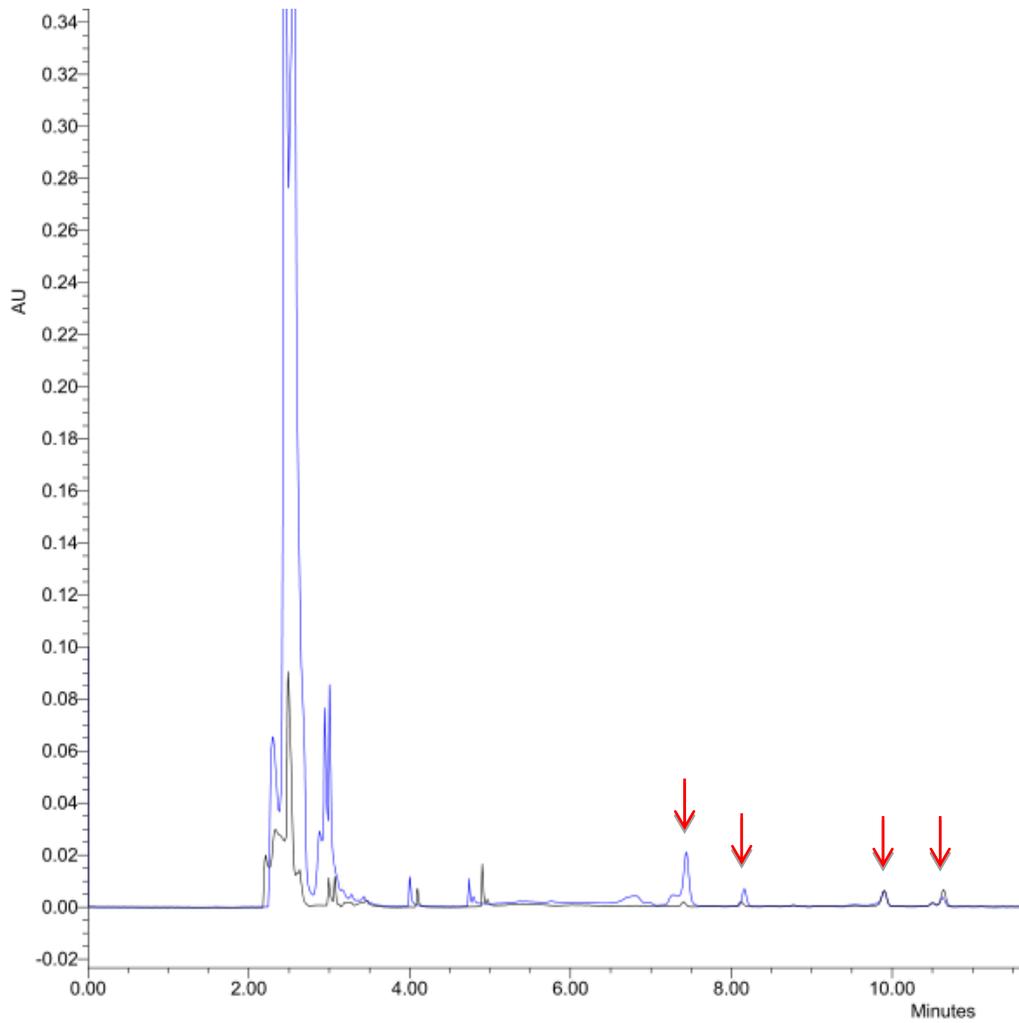
**Figura 1.** Cromatogramas a 254 nm de caldos de cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB tras 5 días cultivo. La línea azul corresponde a el caldo de un cultivo en medio M9 y la línea negra a un caldo de un cultivo en medio M9 suplementado con 25 μM FeCl<sub>3</sub>. Los compuestos de interés se señalan con flechas rojas.



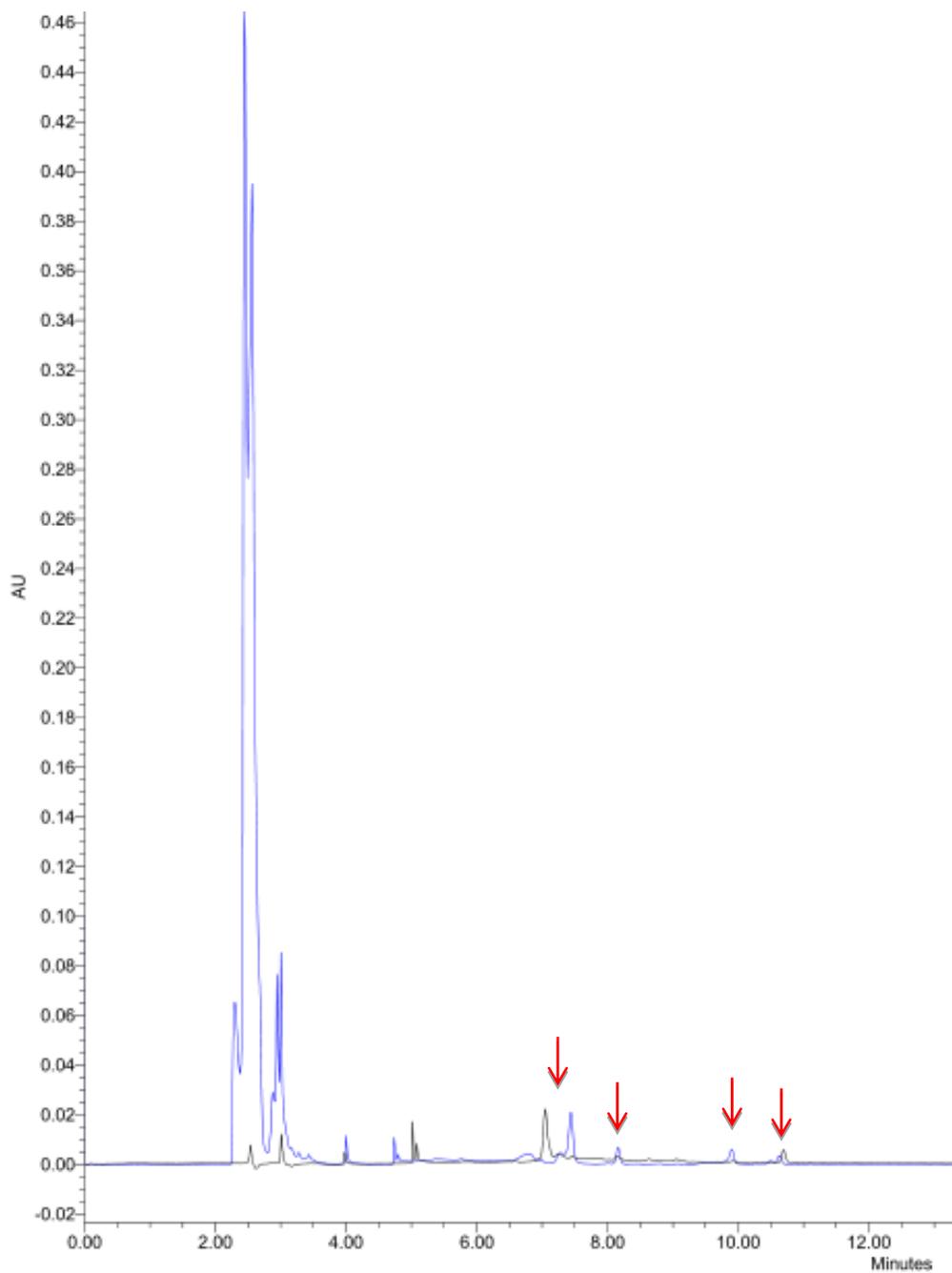
**Figura 2.** Cromatogramas a 254 nm de caldos de cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB tras 8 días de cultivo. La línea azul corresponde a el caldo de un cultivo en medio M9 y la línea negra a un caldo de un cultivo en medio M9 suplementado con 25  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ . Los compuestos de interés se señalan con flechas rojas.



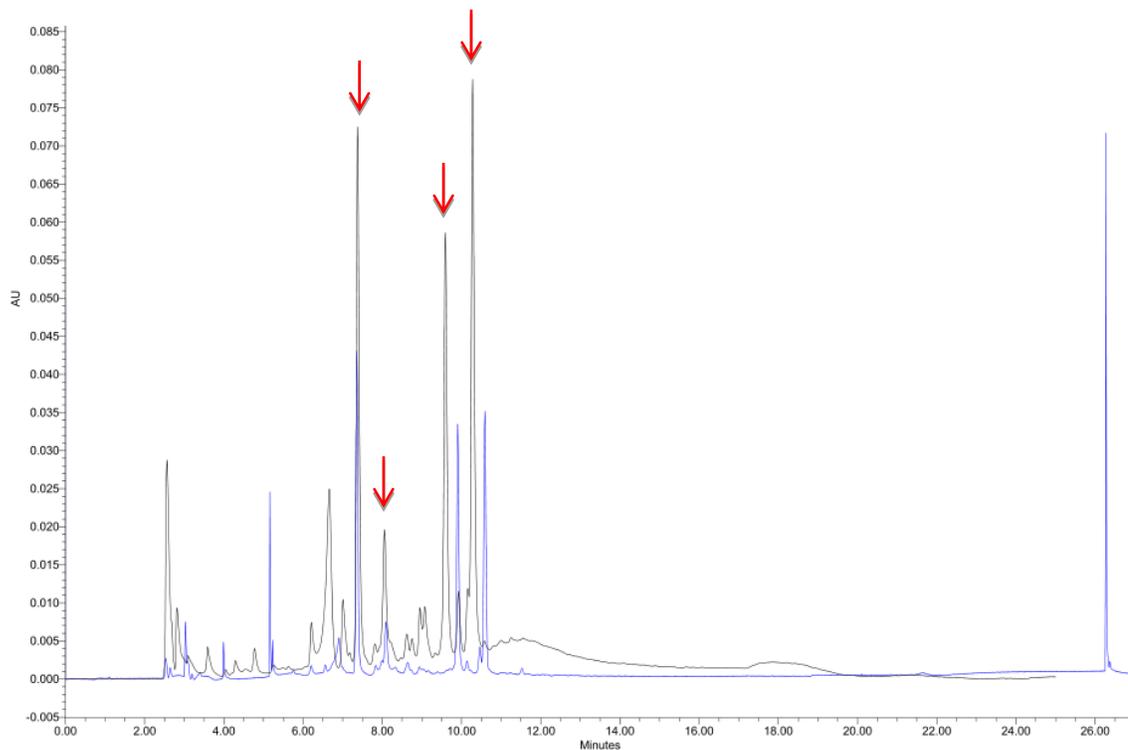
**Figura 3.** Espectros absorción UV-Visible de los compuestos: A) Compuesto 1 (RT 7,362), B) Compuesto 2 (RT 8,094), C) Compuesto 3 (RT 9,911) y D) Compuesto 4 (RT 10,596)



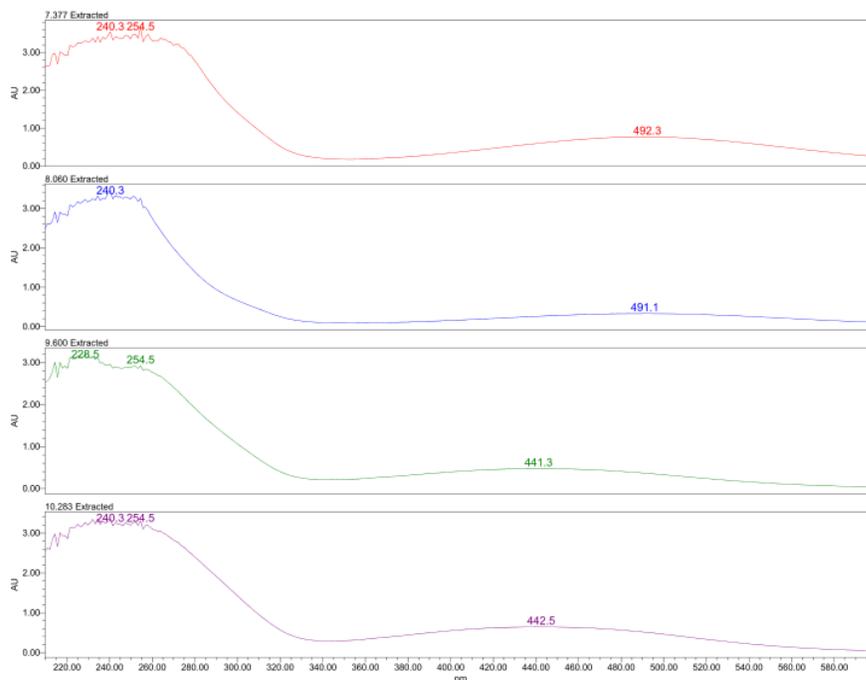
**Figura 4.** Cromatograma a 254 nm de muestra de caldo de cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB tras 8 días de cultivo. La línea azul corresponde a el caldo de un cultivo en medio M9 tratado con 5 mL de solución acuosa 1% de  $\text{FeCl}_3$  y la negra a uno en igualdad de condiciones de cultivo, pero tratado con 2 mL de la misma solución. Los compuestos de interés se señalan con flechas rojas.



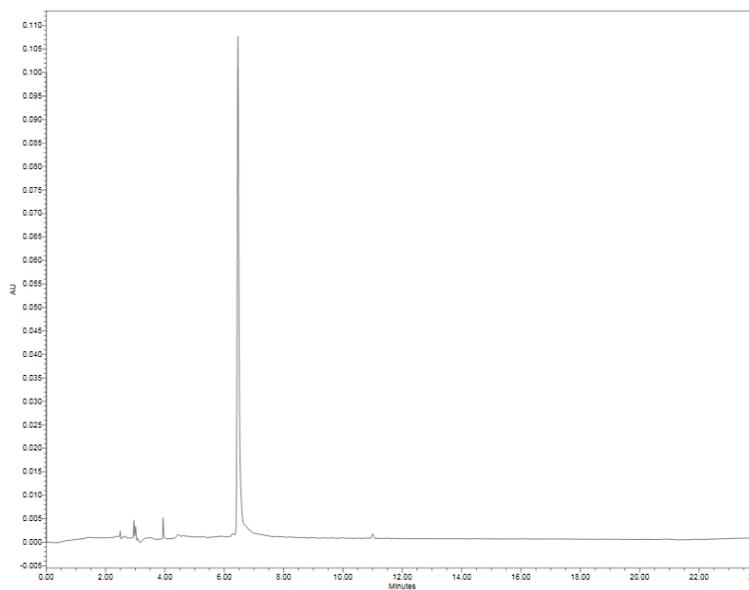
**Figura 5.** Cromatograma a 254 nm de muestra de caldo de cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB tras 8 días de cultivo en medio M9 tratado con 5 mL de solución acuosa 1% de  $\text{FeCl}_3$ . La línea negra corresponde a caldos con pre-tratamiento por columna de XAD-16 y la línea azul corresponde a caldos sin este pre-tratamiento



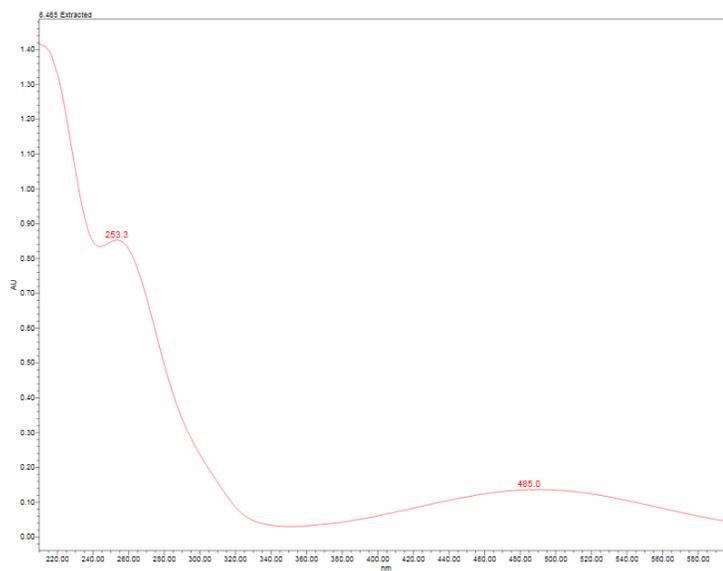
**Figura 6.** Cromatograma comparativo entre HPLC analítico y semipreparativo de caldos de cultivo de *Pseudogymnoascus* sp. 131209-E2A-C5II-EB a 254 nm. La línea azul corresponde a a los caldos cargados en una columna C18 analítica, mientras que la línea la misma mezcla y volumen de caldos v a la semipreparativa. Las posiciones de los peaks de interés se indican con flechas rojas.



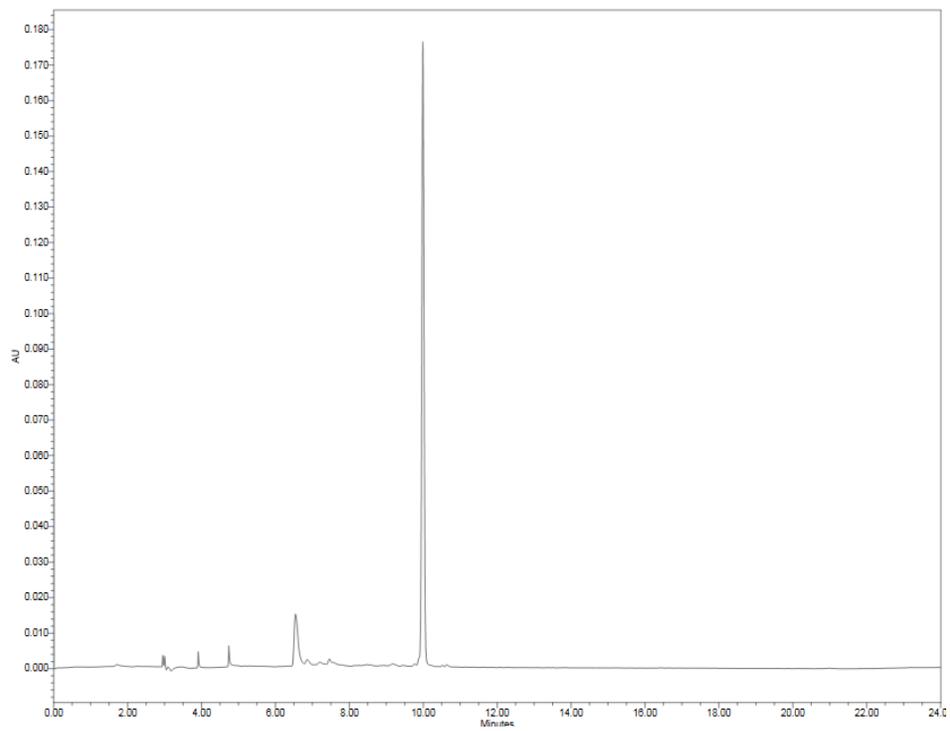
**Figura 7.** Espectros absorción UV-visible de compuestos de interés en HPLC semipreparativo.



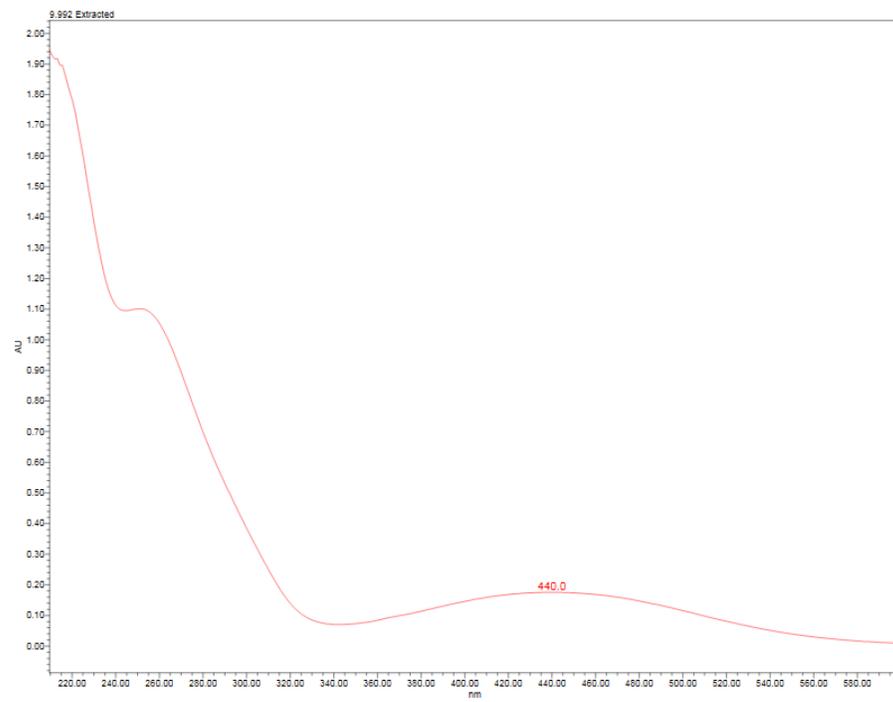
**Figura 8.** Cromatograma a 440 nm del compuesto 1 (RT 7,362) tras la purificación en el HPLC semipreparativo.



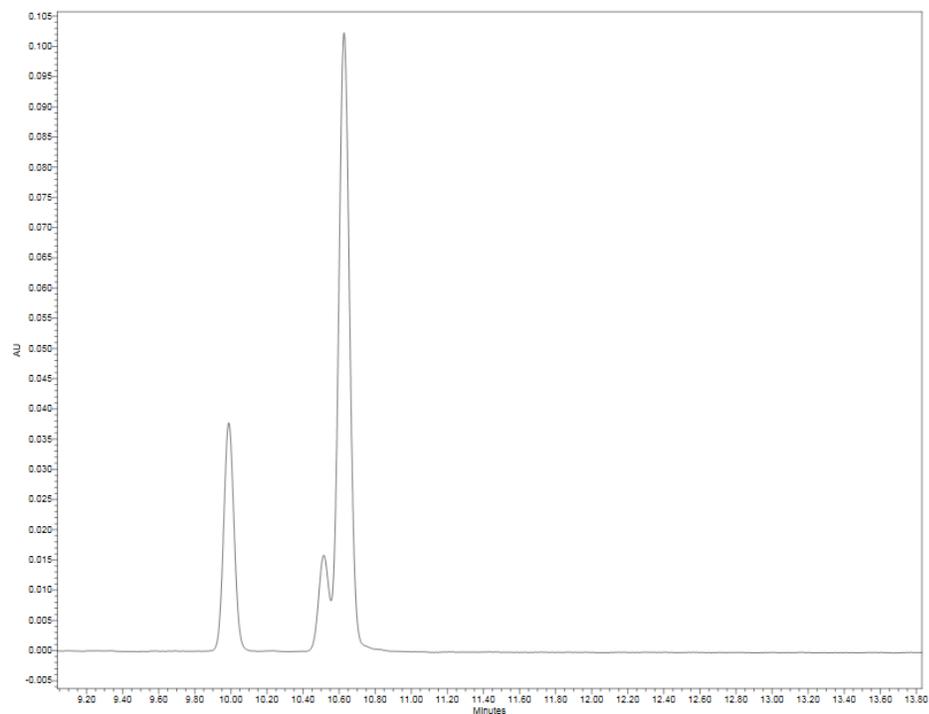
**Figura 9.** Espectro absorción UV-Visible del compuesto 1 (RT 7,362)



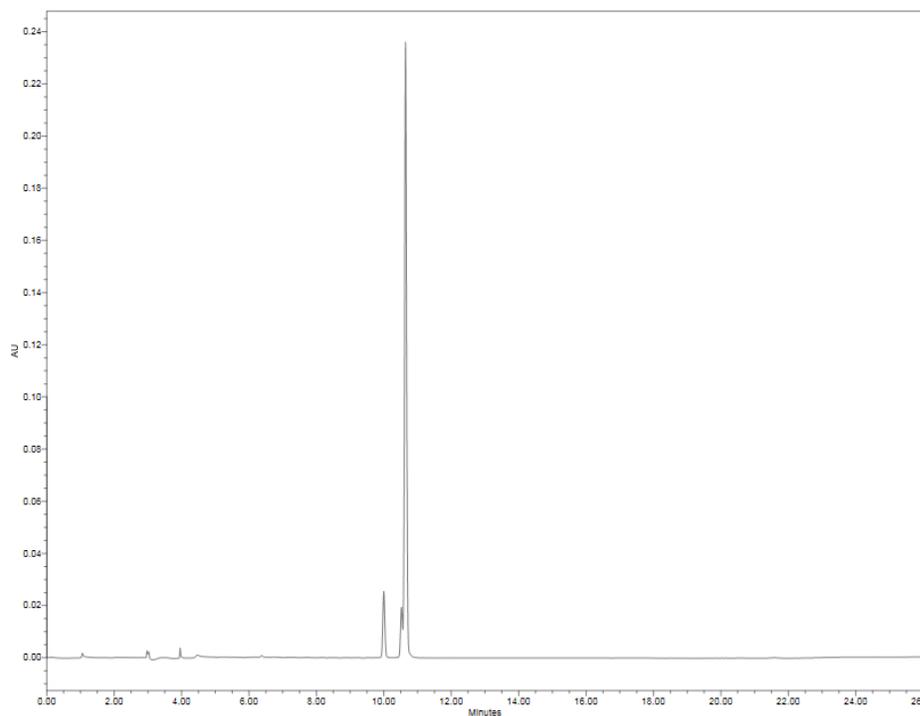
**Figura 10.** Cromatograma a 440 nm del compuesto 3 (RT 9,911) tras la purificación en el HPLC semipreparativo.



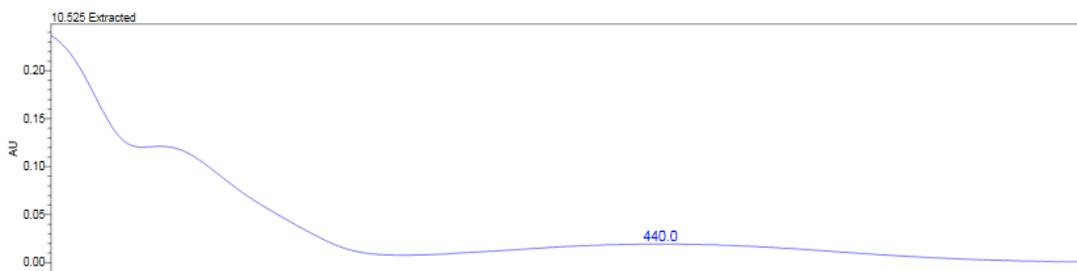
**Figura 11.** Espectro UV-Visible compuesto 3 (RT 9,911)



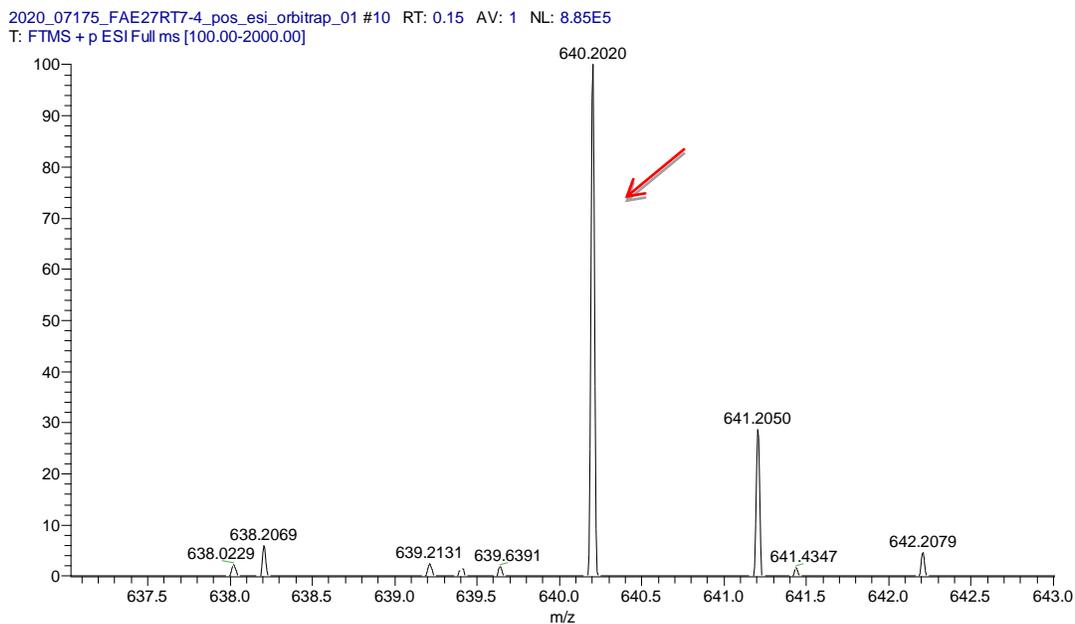
**Figura 12.** Cromatograma a 440 nm del compuesto 4 (RT 10,596) tras la purificación en el HPLC semipreparativo.



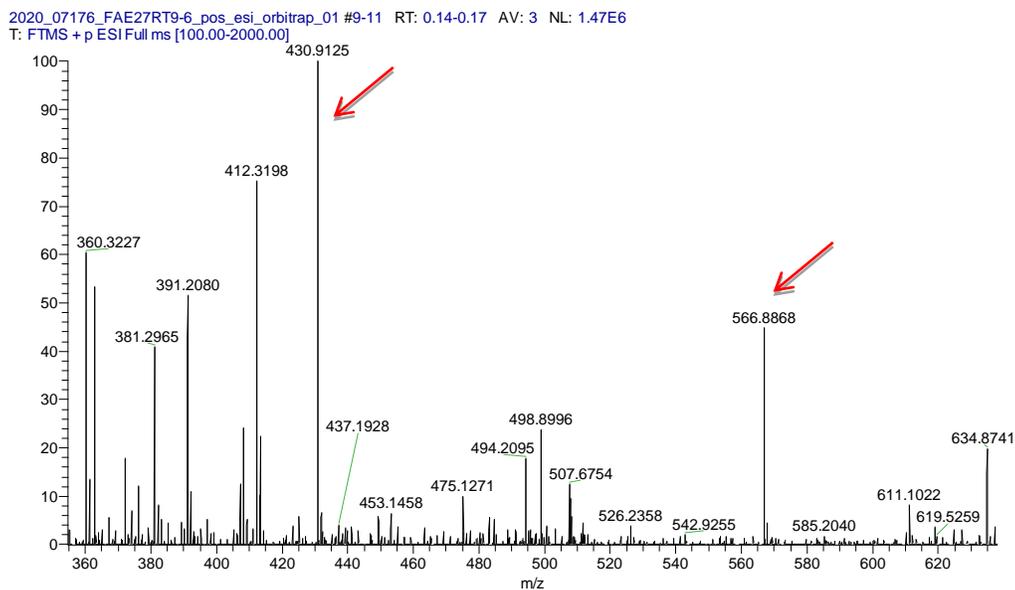
**Figura 13.** Cromatograma a 440 nm de compuesto 4 (RT 10,596) tras segunda purificación en el HPLC semipreparativo.



**Figura 14.** Espectro absorción UV-Visible compuesto 4 (RT 10,596) tras segunda purificación

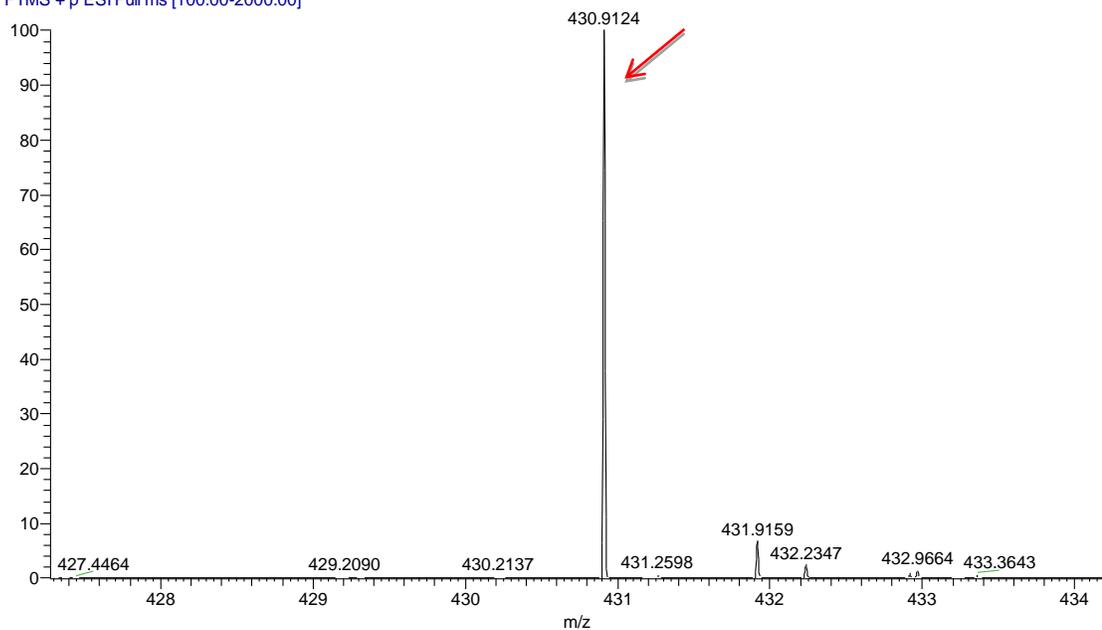


**Figura 15.** Espectro de Masas de alta resolución del colectado de compuesto 1 (RT 7,362). La flecha roja indica el compuesto de interés.



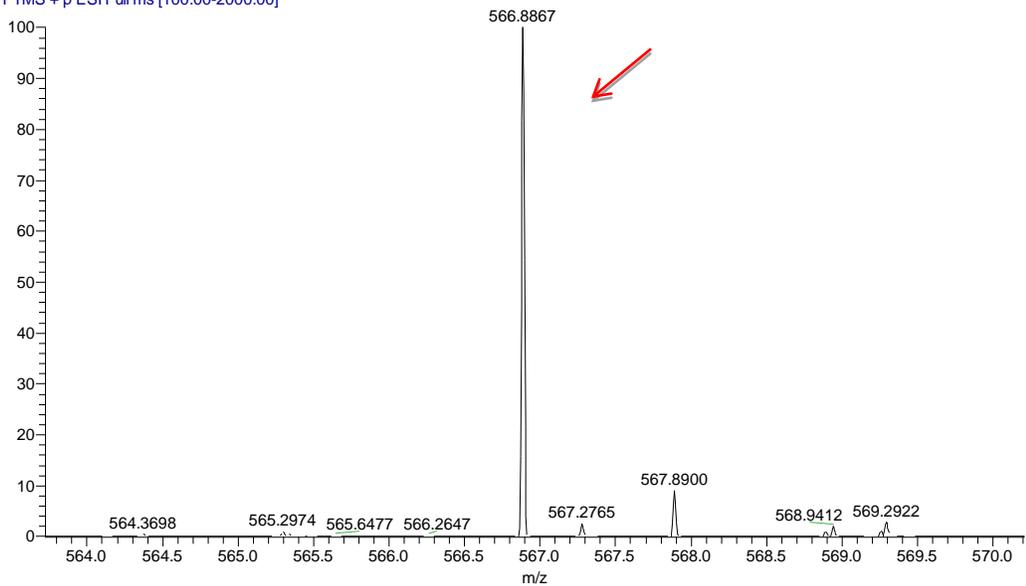
**Figura 16.** Espectro de Masas de alta resolución del colectado de compuesto 3 (RT 9,911). La flecha roja indica los compuestos de interés.

2020\_07176\_FAE27RT9-6\_pos\_esi\_orbitrap\_01 #8-12 RT: 0.12-0.19 AV: 5 NL: 1.38E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



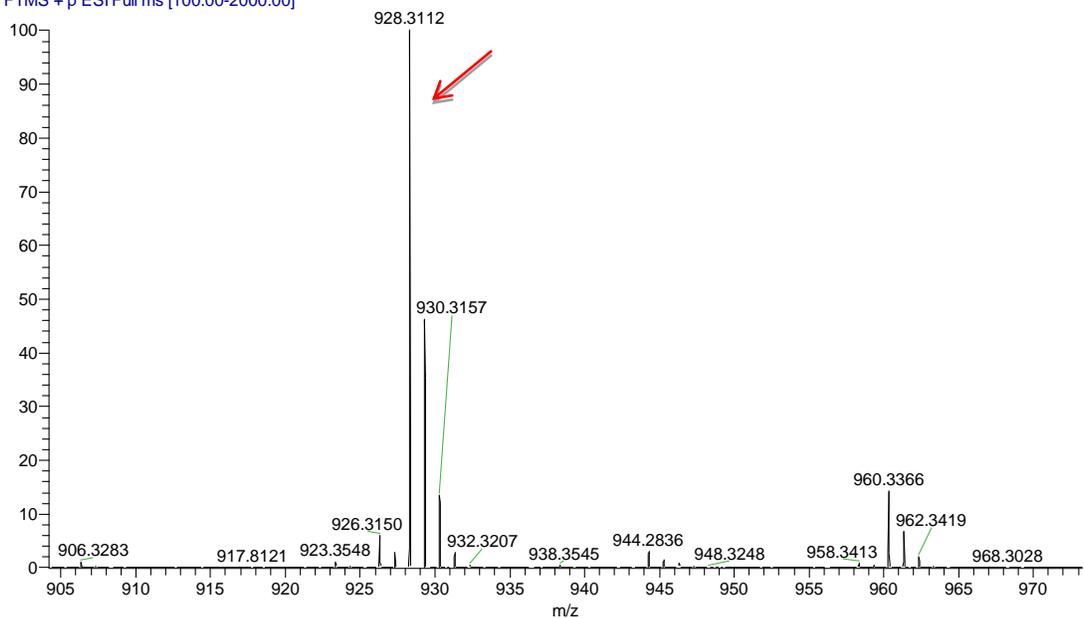
**Figura 17.** Espectro de Masas de alta resolución del compuesto 3.1 colectado a RT 9,911. La flecha roja indica el compuesto de interés.

2020\_07176\_FAE27RT9-6\_pos\_esi\_orbitrap\_01 #8-12 RT: 0.12-0.19 AV: 5 NL: 6.27E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



**Figura 18.** Espectro de Masas de alta resolución del compuesto 3.2 compuesto colectado a RT 9,911. La flecha roja indica el compuesto de interés.

2020\_07177\_FAE27RT10-2\_pos\_esi\_orbitrap\_01 #9-13 RT: 0.13-0.20 AV: 5 NL: 1.61E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



**Figura 19.** Espectro de Masas de alta resolución compuesto 4 (RT 10,596) La flecha roja indica el compuesto de interés.