

# GMO

## GENÉTICA DE MICROORGANISMOS





## GMO 1

**ESTANDARIZACIÓN DE MÚLTIPLEX-PCR ACOPLADA A SECUENCIACIÓN MASIVA PARA EL DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PATÓGENOS VIRALES QUE AFECTAN LA AVICULTURA**

Perbolianachis P<sup>1</sup>, A. Marandino<sup>1</sup>, C. Techera<sup>1</sup>, G. Tomás<sup>1</sup>, Y. Panzera<sup>1</sup>, R. Pérez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. paulaperbolianachis@fcien.edu.uy

La avicultura industrial mundial es propicia a diversas enfermedades infecciosas que le generan grandes pérdidas económicas, siendo los patógenos virales particularmente importantes por su gran incidencia. Las infecciones virales únicas o co-infecciones dificultan en gran medida los diagnósticos clínicos al presentar similar sintomatología. A tales efectos, es de suma importancia optimizar las metodologías de identificación y tipificación genética de los microorganismos involucrados en la infección, permitiendo a los profesionales responsables de la sanidad aviar tomar medidas de control y prevención acorde a la problemática presentada. En el presente estudio se estandarizó una metodología de diagnóstico y caracterización simultánea de agentes virales mediante múltiplex-PCR acoplada a secuenciación masiva. Particularmente, se enfocó en el diagnóstico y tipificación de virus aviarios asociados a patologías respiratorias (Bronquitis, Influenza, Laringotraqueitis, Metapneumovirus y Newcastle) e inmunosupresores (Anemia infecciosa, Gumboro y Marek). La metodología fue estandarizada empleando cepas vacunales y procesamiento bioinformático de los datos obtenidos en un equipo Illumina MiSeq. La metodología desarrollada mostró alta sensibilidad y efectividad, constituyendo una técnica promisoriosa para futuros estudios de epidemiología molecular de virus que afecten la cría comercial de aves.

## GMO 2

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS ARGENTINAS Y URUGUAYAS DE LOS PRINCIPALES LINAJES SUDAMERICANOS DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA AVIAR**

Williman J.<sup>1</sup>, R. Pérez<sup>1</sup>, G. Tomás<sup>1</sup>, A. Vagnozzi<sup>2</sup>, A. Marandino<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay; <sup>2</sup>Instituto de Virología, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina. jwilliman@fcien.edu.uy

El virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) es responsable de la bronquitis infecciosa, una patología muy problemática de la avicultura industrial mundial. IBV tiene un genoma de ARN simple hebra 27,6 kb de longitud. En la industria avícola sudamericana circulan dos linajes principales, denominados GI-11 y GI-16, que tienen distinto origen, distribución y prevalencia, y provocan frecuentes brotes causando importantes pérdidas económicas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente dos cepas uruguayas y dos argentinas, de los linajes GI-11 y GI-16. La metodología consistió en el aislamiento viral en cavidad alantoidea de huevos embrionados y una posterior purificación de las partículas virales en colchón de sacarosa y filtración. Posteriormente se realizó una extracción de ARN, generación de ADNc doble hebra y librerías (Nextera Flex kit). La secuenciación fue performada en la plataforma Illumina Genome Analyzer II X. El genoma completo de las cepas fue secuenciado correctamente, y ambos presentaron 13 marcos abiertos de lectura. El análisis de estos genomas mostró que, a pesar de pertenecer a linajes diferentes, tienen alta homología en la mayoría de sus genes. Todos sus genes a excepción de S1 tienen una identidad nucleotídica mayor al 97%. La comparación de estas secuencias con tres genomas disponibles del linaje GI-16 de origen asiático y europeo reveló que más de un evento de recombinación estuvo involucrado en la evolución de estos linajes en nuestra región.

## ANÁLISIS DEL VIROMA PRESENTE EN AVES DE CORRAL EN URUGUAY

Fuques E., A. Marandino, Y. Panzera, R. Perez, C. Techera, G. Tomás. <sup>1</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. [efuques@fcien.edu.uy](mailto:efuques@fcien.edu.uy)

Los virus son los organismos más abundantes del planeta, y son responsables de un gran número de enfermedades infecciosas, constituyendo un grave problema para la salud, humana y animal. Particularmente, en la industria avícola de cría intensiva los patógenos virales causan pérdidas económicas devastadoras. Recientemente, la aplicación de técnicas de secuenciación de alto rendimiento permite caracterizar la comunidad viral (viroma) presente en una muestra biológica. El presente trabajo tiene como objetivo la caracterización de virus con genoma de RNA en muestras provenientes de aves de corral. Para ello se realizó un protocolo de enriquecimiento de partículas virales y posteriormente la aplicación de protocolos de secuenciación masiva a partir de muestras de tejido de pollos. Las mismas han sido previamente diagnosticadas como co-infectantes para el virus de la Bronquitis Infecciosa y el virus de la Enfermedad Infecciosa de la Bursa, algunos de los virus más relevantes en la industria avícola que ocasionan grandes pérdidas económicas. Los resultados permitieron detectar la formación de *contigs* que se corresponden, además de con los virus previamente detectados, con especies del Género *Rotavirus*. La construcción de filogenias a partir de las secuencias generadas permitió clasificar las mismas como *Rotavirus Aviar*. Este trabajo constituye el primer reporte de este virus entérico en Uruguay, siendo un importante aporte para la mejora del estado sanitario de las granjas.

## PLAYING ON THE SPECTRUM: HAPLOTYPES EVOLUTION OF AVIAN CORONAVIRUS

Brandão P.E., A. Da Hora<sup>2</sup>, S. Silva, S. Taniwaki, M. Berg<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Brasil; <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, MG, Brazil; <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Section of Virology, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden. [paulo7926@usp.br](mailto:paulo7926@usp.br)

RNA (and some DNA) viruses evolve under the quasispecies model, a population of genomes in a mutant spectrum, each individual genome characterized by a collection of alleles in different sites known as the haplotype. To shed light on the dark matter of the genome-wide haplotypes evolution in large RNA viruses, Avian *coronavirus* was used as a model virus for HTS (high throughput sequencing)-based complete genome haplotyping after passages of two field strains in chicken embryonated eggs. For the 1st and 3rd passages of strain 23/2013, virus loads were 6.699 log copies/ $\mu$ L and 6 log copies/ $\mu$ L and, for 38/2013, 5.699 log copies/ $\mu$ L and 2.699 log copies/ $\mu$ L, respectively. First passage of strain 23/2013 contained no variant haplotype, while, for the 3<sup>rd</sup> passage, five variant haplotypes were found, with >99.9% genome identity with each other and with the dominant haplotype. Regarding strain 38/2013, five variant haplotypes were found for the 1<sup>st</sup> passage, with >99.9% full genome identity with each other and with the dominant haplotype, and a single variant haplotype was found for the 3<sup>rd</sup> passage. Mutations were found on the replicase (ORF1ab) and on structural genes such as the receptor-binding spike glycoprotein, amongst others. This is an indication that coronaviruses might go through extinction and emergence of haplotypes with hotspots of selection in genes with a role on receptor binding and replication/transcription leading to a spectrum inflation/deflation evolution model.

## GMO 5

**HETEROGENEIDAD DE CEPAS DE CPV EN URUGUAY Y LA REGIÓN**

Condon E<sup>1</sup>, D. Bucafusco<sup>2</sup>, L. Calleros<sup>1</sup>, A. Marandino<sup>1</sup>, G. Tomás<sup>1</sup>, Y. Panzera<sup>1</sup>, R. Pérez<sup>1</sup>, S. Grecco<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Genética de Microorganismos, Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Argentina. sgrecco@fcien.edu.uy

*Parvovirus canino* (CPV) es un virus pequeño (~5.2 kb), de ADN simple hebra de polaridad negativa. Su genoma codifica para proteínas estructurales (VP1/VP2), y no-estructurales (NS1/NS2). CPV es el agente causal de la parvovirus canina, una de las enfermedades infecciosas más comunes que afecta principalmente a cachorros, caracterizada por causar gastroenteritis hemorrágica y altas tasas de mortalidad. Existen tres variantes antigénicas de CPV clasificadas de acuerdo al aminoácido 426 de la proteína VP2: 2a (Asn), 2b (Asp) y 2c (Glu). Estas variantes no están relacionadas filogenéticamente y presentan diferentes grados de variabilidad genética. La distribución de las variantes es heterogénea en los distintos países, pero no se conoce el significado de esta variabilidad. El objetivo de este trabajo fue realizar un relevamiento de las cepas circulantes en la región del Río de la Plata. Se analizaron muestras presuntivas de parvovirus procedentes de Uruguay (n=14) y Argentina (n=13) colectadas durante 2017-2019. El diagnóstico se realizó amplificando por PCR una región del gen VP2. El análisis de las secuencias reveló que las muestras uruguayas corresponden a un linaje asiático de la variante 2a mientras que las argentinas pertenecen a un linaje europeo de la variante 2c. Estos resultados indican que, a pesar de la proximidad geográfica, las variantes de CPV locales pueden ser muy divergentes. Factores inmunológicos, genéticos e históricos de las poblaciones caninas podrían ser los responsables de esta notable divergencia poblacional.

## GMO 6

**CARACTERIZACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE LOS GAMMA PAPILOMAVIRUS DE PRIMATES MEDIANTE ANÁLISIS BAYESIANO**

Breziski M.A.R.<sup>1</sup>, A.S. Fachini<sup>1</sup>, C. Sanchez Fernandez<sup>1</sup>, A.C.A. Culasso<sup>2</sup>, M.E. Totaro<sup>3</sup>, E.M. Bolatti<sup>3</sup>, D. Chouhy<sup>3</sup>, A.A. Giri<sup>3</sup>, R.H. Campos<sup>2</sup>, D.J. Liotta<sup>1</sup>, M.M. Kowalewski<sup>4,5</sup>, I. Badano<sup>1,4</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular Aplicada, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Misiones, Argentina; <sup>2</sup>Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; <sup>3</sup>Laboratorio de Virología Humana, Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET, Rosario, Argentina; <sup>4</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; <sup>5</sup>Estación Biológica Corrientes (EBCo-MACN-CONICET), Corrientes, Argentina. inesbadano@gmail.com

Los Gamma-Papilomavirus (Gamma-PV) son virus de ADN capaces de infectar el epitelio de los primates y causar proliferaciones benignas o persistir de modo asintomático. La hipótesis actual sobre su origen y dispersión, es aún motivo de debate. El objetivo fue reconstruir la historia evolutiva de los Gamma-PV mediante el análisis de los perfiles bayesianos (Bayesian SkyLine Plots, BSK) y contextualizar la información obtenida en el marco temporal de la evolución de los primates. Los gráficos de BSK fueron estimados con el programa BEAST. Se analizó un set de datos con 120 secuencias de PV aislados de Catarrinos y Platorinos obtenidas en Genbank y/o por nuestro grupo de trabajo (N=2; SnPv1 y AcPV1 identificados en monos sudamericanos *Sapajus nigritus* y *Alouatta caraya*). Los criterios de análisis fueron: reloj relajado (UNL) y una tasa de mutación de 1,95 E-8 s/s/y. Se corrieron 10 millones de cadenas en muestreos de a 1000. La convergencia y la visualización del gráfico de BSK fue realizada en Tracer. La historia demográfica de los Gamma-PVs inició hace 65.000.000 de años. Este género viral presentó dos expansiones marcadas: hace 18-20 y 40-45 millones de años atrás. Estas fechas coinciden con la aparición de los Parvódenes Platorinos y Catarrinos (45 MYA) y su posterior diversificación (20 MYA). El perfil descripto para Gamma PVs podría reflejar la expansión poblacional viral, asociada a la presencia de nuevos nichos para la infección viral durante la especiación de los primates.

## DETECCIÓN DEL GEN ADN POLIMERASA DEL VIRUS DE LA VARICELA ZOSTER EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO EN ENCEFALITIS INFANTIL: A PROPÓSITO DE UN CASO

Castañeira M.<sup>1</sup>, M. Sosa<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Hospital de Niños Dr. O. Alassia, Santa Fe, Argentina.  
marcastaneira03@hotmail.com

El virus de la varicela zoster (vV-Z) pertenece a la familia de los herpes virus. La encefalitis por el vV-Z es una complicación poco frecuente. La disfunción neurológica por inflamación del sistema nervioso se presenta en la enfermedad exantemática en remisión. El objetivo del trabajo es describir los antecedentes, el diagnóstico clínico y molecular en un caso de encefalitis por vV-Z. Caso clínico: Niño de sexo masculino de 8 años de edad, inmunocompetente. Se interna en cuidados especiales del hospital por presentar lesiones cutáneas generalizadas sobreinfectadas en contexto febril y somnolencia. En internación a los 6 días agregó complicaciones neurológicas: ataxia cerebelosa bilateral post infecciosa, disartria y problemas para caminar (marcha inestable-ebrio). El LCR presentó características físico-químicas normales y un recuento de glóbulos blancos 50 GB/mm<sup>3</sup> (60% de mononucleares). Se detectó el gen ADN polimerasa del virus varicela zoster (98 pb) en líquido cefalorraquídeo por nested PCR según lo publicado por Casas *et al.*. Para la extracción y purificación se utilizaron columnas. Se amplificó una secuencia altamente conservada del ADN, visualizándose los amplicones en gel de agarosa al 2%. Tratamiento Aciclovir y antibióticos. Evolución favorable. La implementación en el hospital de esta determinación en líquido cefalorraquídeo fue fundamental en este caso de encefalitis por vV-Z para establecer el tratamiento adecuado, disminuir la estadía hospitalaria y evitar secuelas definitivas.

## ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN *Campylobacter fetus* DEL GANADO URUGUAYO UTILIZANDO SECUENCIAS DE CRISPR

Calleros L.<sup>1</sup>, M. Barcellos<sup>1</sup>, C. Morsella<sup>2</sup>, F. Paolicchi<sup>2</sup>, R. Pérez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay;  
<sup>2</sup>Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Sanidad Animal, INTA Balcarce, Argentina.  
calleros@fcien.edu.uy

*Campylobacter fetus* es una bacteria gram-negativa que afecta a un amplio rango de hospederos vertebrados. Existen tres subespecies de *C. fetus*: *C. fetus fetus* (Cff), que tiene un amplio rango de hospederos mamíferos, y es transmitida por vía oral-fecal, *C. fetus venerealis* (Cfv), que es exclusiva de bovinos y causa la campilobacteriosis genital bovina (CGB), transmitida por vía venérea, y *C. fetus* subsp. *testudinum* (Cft), la cual se aísla de reptiles aparentemente sanos. La CGB provoca grandes pérdidas económicas mediante la reducción de las tasas de preñez y procreo. En los ovinos, Cff también puede ser causa de pérdidas reproductivas. En humanos, Cff y Cft son consideradas patógenos emergentes. Las secuencias de CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) son las más variables del genoma de *C. fetus* analizadas hasta ahora. Estas secuencias evidencian una diferenciación marcada de los aislamientos de distintos hospederos, y cierta diferenciación geográfica. En este trabajo se utilizan secuencias del locus CRISPR1 para analizar la diversidad genética en aislamientos bovinos de *C. fetus* en Uruguay. Todas las cepas bovinas uruguayas están estrechamente relacionadas; sin embargo la variación encontrada es mayor a la esperada, ya que el número de patrones diferentes es alto en comparación con lo encontrado hasta ahora. Esta gran variabilidad pone de manifiesto la importancia de la vigilancia epidemiológica y el estudio de las vías de transmisión de este patógeno en el ganado uruguayo.

## GMO 9

## DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE *Campylobacter fetus* EN EL GANADO BOVINO MEDIANTE MÉTODOS MOLECULARES

Barcellos M.<sup>1</sup>, L. Calleros<sup>1</sup>, L. Betancor<sup>2</sup>, R. Delpiazzo<sup>3</sup>, M. Fraga<sup>4</sup>, C. Morsella<sup>5</sup>, F. Paolicchi<sup>6</sup>, R. Pérez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay; <sup>2</sup>Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; <sup>3</sup>Departamento de Salud de los Sistemas Pecuarios, EEMAC, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay; <sup>4</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA, La Estanzuela, Plataforma de Salud Animal, Uruguay; <sup>5</sup>Laboratorio de Bacteriología, Departamento de Sanidad Animal, INTA Balcarce, Argentina. mailasb@gmail.com

*Campylobacter fetus* afecta un amplio rango de hospederos, incluyendo humanos. Presenta tres subespecies. *C. fetus subsp. testudinum* se encuentra en reptiles y puede infectar humanos, *C. fetus subsp. fetus* induce abortos en ovinos y bovinos, y *C. fetus subsp. venerealis* causa la Campilobacteriosis genital bovina provocando infertilidad y abortos. *Campylobacter fetus* es fastidiosa de cultivar en el laboratorio, por lo que los métodos moleculares resultan ser una buena herramienta para su detección y caracterización en muestras de campo. Se relevó la presencia de *C. fetus* en bovinos en Uruguay mediante métodos moleculares y de aislamiento. Se analizaron 1027 muestras de raspaje prepucial y de mucus vaginal de 113 establecimientos. Las muestras fueron analizadas en *pooles* mediante qPCR desarrollada en nuestro laboratorio. Los casos positivos fueron confirmados por secuenciación. En paralelo se realizó el cultivo. Se obtuvieron aislamientos en 1,6% de las muestras y 14% de los establecimientos. Las cepas se analizaron por PCR para determinar la subespecie. El 88% correspondió a *Cfv* y 12% a *Cff*. Los resultados de qPCR y de cultivo coincidieron en todos los casos en los cuales este último fue positivo, habiendo casos en los cuales la qPCR fue positiva pero no se pudieron aislar las cepas. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la qPCR es más sensible que los métodos de cultivo, siendo un buen método de *screening* en muestras de campo. La presencia del patógeno en Uruguay indica la importancia de continuar con su relevamiento para el desarrollo de estrategias de control.

## GMO 10

## WHOLE GENOME SEQUENCING OF FOOD-BORNE PATHOGEN *Clostridium* GENUS AND BIOINFORMATICS ANALYSIS TO IDENTIFY SEQUENCES INVOLVED IN FOOD SAFETY IN PERU

Obispo D.<sup>1,2</sup>, J.C. Setubal<sup>3</sup>, L. Moura<sup>3</sup>, D. Amgarten<sup>3</sup>, E. Valencia<sup>4</sup>, M.L. Guevara<sup>1</sup>, M. Bawn<sup>5,6</sup>, R. Fujita<sup>1</sup>, O. Acosta<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Centro de Genética y Biología Molecular, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres, Lima, Perú; <sup>2</sup>Grupo de Investigación de Genética, Ómicas, Bioinformática y Desarrollo Computacional, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú; <sup>3</sup>Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Laboratorio de Bacteriología, Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión, UNMSM, Lima, Perú; <sup>5</sup>Quadram Institute Bioscience, Norwich Research Park, Colney, Norwich, United Kingdom; <sup>6</sup>Earlham Institute, Norwich Research Park, Colney, Norwich, United Kingdom. daimaria10@gmail.com

The Whole-genome sequencing and its interpretation by bioinformatics analysis is a great advance for the detection of foodborne pathogens. It gives an improved resolution to rapidly obtain critical sequence information required to develop a specific detection method applied to Outbreaks of Foodborne Illness and Food Safety Surveillance. We evaluated the whole-genome sequence of pathogen *Clostridium* genus from an isolated strain in Peru and performed bioinformatics analysis to identify sequences involved in food safety. The pathogen was isolated and purified. DNA was extracted and processed for sequencing on Illumina MiSeq platform. The bioinformatic analysis includes the trimming, assembly and annotation of the genome using the following tools: FastQC, BWA, Spades, QUAST, MegaBLAST, Prokka, PGAAP-NCBI and CGView. The genome shared high identity with *C. botulinum* CDC\_67071 and *C. botulinum* CDC\_1632 strains. The genome showed 3.9 Mb size with 90X coverage and 559 contigs of 1.7 kb N50. We confirmed the presence of *C. botulinum* and gene-coding sequences related to the virulence factor, such as BoNTB gene. BoNTB has the ability to produce neurotoxin B and has been associated with cases of botulism in humans through a common source of infection, such as consumption of commercial food products. We characterized *C. botulinum* strains isolated from a source of meat and showed that whole-genome analyses provided a higher resolution strain discrimination compared to conventional methods for epidemiological studies adequate for effective monitoring of botulism cases.

## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Clostridium difficile* EN LECHONES EN SISTEMAS DE CRÍA INTENSIVA

Coppari C.R.<sup>1,2</sup>, F. Bessone<sup>3</sup>, D. Ruggeri<sup>3</sup>, M.L. Soriano Perez<sup>1</sup>, M. Dibarbora<sup>1</sup>, J. Cappuccio<sup>1</sup>, F. Alustiza<sup>1</sup>. <sup>1</sup>EEA INTA Marcos Juárez, Argentina; <sup>2</sup>UNNOBA, Argentina; <sup>3</sup>INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Argentina.  
carocoppari@hotmail.com.ar

*Clostridium difficile* es un bacilo, anaerobio estricto, al que se reconoce como agente causal de diferentes patologías de carácter intestinal que afectan animales, las más importantes de las cuales son la diarrea. El objetivo del trabajo fue aislar, identificar y tipificar molecularmente cepas de *C. difficile* (CD) obtenidas a partir de materia fecal de lechones neonatos de granjas porcinas. Se muestrearon 120 cerdos (1, 2 y 3 semanas de vida). El cultivo de CD se realizó en medio cromogénico y selectivo-diferencial CHROMagar™. La identificación se confirmó por MALDI-TOF. La caracterización molecular fue por PCR con *primers* para los genes *tcdA* y *tcdB* (toxinas A y B) y *cdtA* y *cdtB* (toxina binaria). Se pudo aislar e identificar *C. difficile* en 61,66% de las muestras, lo que indica una alta circulación de la bacteria en las granjas. La mayor circulación se da en las granjas de producción intensiva de más de 2000 madres (60-80%) vs. granjas de menos de 300 madres (43,33%). Se detectó la presencia de las tres toxinas, con una prevalencia incrementada de la toxina B, seguida de la toxina binaria. Se vio que en los aislamientos negativos para la toxina B, fueron negativos para la toxina A o la toxina Binaria. En la gran mayoría de los aislamientos positivos para las toxinas, los lechones no presentaban ningún síntoma de la presencia de CD. Este es el primer informe de prevalencia de *C. difficile* en lechones en sistemas de cría intensiva, con y sin diarrea, en Argentina. No se identificó un vínculo claro entre el aislamiento de esta bacteria y la diarrea neonatal porcina.

## IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS A PARTIR DE SÍNTOMAS FOLIARES DE MAÍZ EN EL SUR DE CÓRDOBA, ARGENTINA

Ruiz M.<sup>1</sup>, V. López Ramirez<sup>2</sup>, E.A. Rossi<sup>1</sup>, N.E. Zuber<sup>2</sup>, A. Lagares<sup>2</sup>, M.G. Balzarini<sup>3</sup>, N.C. Bonamico<sup>1</sup>, S.E. Fischer<sup>1</sup>. <sup>1</sup>INIAB, UNRC-CONICET, Argentina; <sup>2</sup>BBM, UNLP-CONICET, Argentina; <sup>3</sup>UFYMA, UNC-CONICET, Argentina.  
mruiz@ayv.unrc.edu.ar

En Argentina, la presencia de enfermedades bacterianas en maíz se incrementó posiblemente por la ausencia de genotipos resistentes. El objetivo del trabajo fue identificar patógenos bacterianos a partir de síntomas foliares de maíz. Estos síntomas fueron observados en Río Cuarto, Córdoba, Argentina durante el ciclo agrícola 2017/18 en una población diversa de líneas de maíz, desarrollada y provista por CIMMYT. Hojas de maíz sintomáticas se recolectaron y del área afectada se extrajeron muestras y se maceraron en solución fisiológica. Diluciones seriadas fueron sembradas en placas de Petri conteniendo medio Luria-Bertani con fungicida. Las placas se incubaron a 30 °C por 24 h. Se obtuvieron 24 aislamientos bacterianos, a los que se les realizaron pruebas de Gram, catalasa, oxidasa y producción de pigmentos. Estas características permitieron seleccionar 17 aislamientos diferentes a los que se les realizó un análisis de espectrometría de masas (Maldi-Tof). Éste, identificó cinco géneros (*Exiguobacterium* spp., *Curtobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Paenibacillus* spp., *Arthrobacter* spp.). En cinco aislamientos, uno de cada género identificado, se amplificó el gen *ARN16S* con los cebadores *fD1* y *rD1* para su secuenciación y se confirmaron los resultados obtenidos por Maldi-Tof. La identificación de aislamientos bacterianos a partir de síntomas foliares en el sur de Córdoba, Argentina es relevante por su implicancia en programas de mejoramiento genético para resistencia a bacteriosis en maíz.



## GMO 13

### DETECCIÓN Y REPORTE DE GENES PGPR EN UNA CEPA DE *Bacillus altitudinis* AISLADA DE *Ilex paraguariensis*

Cortese I.J.<sup>1,2</sup>, O.A. Svierecz Olivetti<sup>1</sup>, G.Á. Bich<sup>1,2</sup>, M.L. Castrillo<sup>1,2</sup>, P.D. Zapata<sup>1,2</sup>, M.E. Laczeski<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Reca", Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones; <sup>2</sup>CONICET, Argentina; <sup>3</sup>Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Reca", Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Cátedra de Bacteriología, Dpto. de Microbiología, UNaM, Posadas, Misiones, Argentina. CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Argentina. cortesejulietta@gmail.com

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) se encuentran en la rizósfera y/o como endófitos de plantas, ejerciendo efectos benéficos sobre su crecimiento. Los avances vinculados a las tecnologías ómicas permitieron detectar genes de interés asociados a propiedades PGPR. El objetivo del presente trabajo fue detectar y reportar genes PGPR en una cepa de *Bacillus altitudinis* aislada de *Ilex paraguariensis* en Misiones. A partir de las lecturas obtenidas de la secuenciación del genoma de *B. altitudinis* 19R se realizó la búsqueda y análisis de genes con el software Geneious 11. Se utilizaron como referencia las secuencias de genes PGPR obtenidas del genoma anotado de *B. altitudinis* SGAir0031 (CPO22319.1). Se contrastó la información obtenida con la existente en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizando la herramienta Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*). A partir de este procedimiento se obtuvieron las secuencias nucleotídicas para los siguientes genes con los respectivos números de acceso: *fhuD* (MK977717), *narK* (MK977718), *nirB* (MK977719), *pstA* (MK977721), *pstC* (MK977722), *phoA* (MK977720), *nirB* (MK982554), *nirD* (MK982555) y *nifU* (MK982556). Puesto que *B. altitudinis* 19R es una cepa portadora de genes PGPR, futuros estudios de expresión permitirán una comprensión más amplia de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y de su asociación como biofertilizante, siendo ésta una alternativa sustentable para el mejoramiento del rendimiento de cultivos.

## GMO 14

### CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS FÚNGICOS ASOCIADOS A TOMATE EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN HORTÍCOLA DEL SUR DE SANTA FE

Cabodevila V.G.<sup>1,2</sup>, R.N. Pioli<sup>2,3</sup>, P. Cacchiarelli<sup>1,2</sup>, G.R. Rodríguez<sup>1,4</sup>. <sup>1</sup>IICAR-CONICET-UNR, Argentina; <sup>2</sup>Cátedra de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina; <sup>3</sup>IICAR-CIUNR, Argentina; <sup>4</sup>Cátedra de Genética, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Argentina. victoria.cabodevila@unr.edu.ar

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una hortaliza muy cultivada en el mundo. En ocasiones, el bajo rendimiento es atribuido a la susceptibilidad a diferentes patógenos. El objetivo fue caracterizar molecularmente 30 aislamientos obtenidos de plantas sintomáticas de tomate. La amplificación de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN ribosomal fúngico se realizó utilizando los cebadores ITS1 e ITS4. A partir de las secuencias obtenidas de los 30 amplicones se identificaron los géneros y especies fúngicas, utilizando la herramienta BLAST (NCBI). Además, se realizó el alineamiento y agrupamiento de tales secuencias. El dendrograma obtenido diferenció 2 grupos que separan los aislamientos incluidos en el género *Alternaria* (A) y *Fusarium* (F). Para estos aislamientos, las secuencias de los géneros A y F, de 479 pb promedio, se diferenciaron en un 35% incluyendo polimorfismos de nucleótido simple e inserción/delección (INDEL). Dentro del género F, se distinguieron cuatro sub-grupos definidos por las especies *F. equiseti* (F.e), *F. verticillioides* (F.v), *F. graminearum* (F.g) y *F. oxysporum*, las cuales mostraron 6, 21, 13 y 4 variantes de nucleótido simple exclusivas respectivamente. Además, F.v, F.g y F.e presentaron variantes de INDEL exclusivas. Como conclusión, se confirmó la identidad de géneros y especies mayoritariamente citadas como agentes causales de enfermedades en tomate, destacando la importancia de la determinación molecular precisa de las especies patógenas como inicio del proceso de selección de genotipos resistentes a las enfermedades que generan.

## IDENTIFICACIÓN DE *Botrytis allii* EN SEMILLAS Y BULBOS DE CEBOLLA PRODUCIDAS EN LA REGIÓN DE CUYO, ARGENTINA

Valdez J.G.<sup>1</sup>, P.F. Caligiore Gei<sup>1</sup>, C.G. Tarnowski<sup>1</sup>. <sup>1</sup>EEA La Consulta INTA, Argentina.  
valdez.jorge@inta.gob.ar

El cultivo de cebolla para semilla abarca 600 ha en Cuyo. La pudrición del cuello afecta el escapo floral, reduce la producción de semilla y puede transmitirse en éstas a nuevas zonas. La afección es causada por dos especies de *Botrytis*: *B. aclada* y *B. allii*, que se consideraban sinónimos. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de *Botrytis* sp. en semillas de cebolla, determinar su patogenicidad e identificar las especies. Se realizaron análisis de patología en 130 muestras de semillas encontrando *Botrytis* sp. en tres lotes de la campaña 2015/16 y seis de la campaña 2017/18, con niveles de infección del 0,5 al 1%. Se corroboró la patogenicidad de los aislados en bulbos de cebolla. Secuencias ITS (ITS1 e ITS4) se subieron al Genbank como MK968303 y MK973091. La comparación de secuencias inequívocas coincidieron 100% con *B. aclada*. Sin embargo, en la amplificación con los cebadores BA2f y BA1r se obtuvo para todos los aislados una banda de 413 pb. Este fragmento fue digerido con la enzima de restricción XapI, observándose bandas de 413, 298 y 115 pb. Dado que *B. allii* Munn (1917) es un híbrido entre *B. byssoidea* y *B. aclada*, los fragmentos observados corresponden al perfil genético del heterocarionte, el cual también se aisló de bulbos. Este trabajo es el primero en identificar molecularmente la presencia de *B. allii sensu* Munn en Argentina. Los niveles de incidencia (6%) e infección (<1%) son bajos y confirman las condiciones de la región de Cuyo para la producción de semillas. Se pone en duda la eficiencia de ITS para identificar especies heterocariontes.

## UTILIZACIÓN DE CROMATOGRFÍA EN PLACA DELGADA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Penicillium* EN CEBOLLA (*Allium cepa*)

Fontana L.I.<sup>1</sup>, C. Tarnowski<sup>2</sup>, J.G. Valdez<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales; <sup>2</sup>Laboratorio Análisis de Semilla EEA La Consulta INTA, Mendoza, Argentina.  
valdez.jorge@inta.gob.ar

*Penicillium* es un género cuya taxonomía basada en morfología generó a lo largo del tiempo confusiones en la asignación de agentes causales a daños o enfermedades. La quimiotaxonomía es el empleo de perfiles químicos basados en metabolitos secundarios para agrupar especies. A partir de 3 discos de 5 mm de aislados de 14 d (medio CYA) obtenidos de cebollas afectadas en el INTA La Consulta, se extrajeron metabolitos con una mezcla de metanol-diclorometano-acetato de etilo (1:2:3) + ácido fórmico 1% v/v. El extracto se concentró y se disolvió en 50 µL de metanol. En placas de TLC se sembraron 20 µL, que se resolvieron en TEF (Tolueno, Acetato de Etilo y Ác. Fórmico (90%) 5:3:2) en tanque de cromatografía para placa delgada. Las observaciones se hicieron bajo luz UV a 254 y 365 nm. Los perfiles obtenidos se compararon con cepas de *P. albocoremium*, identificadas como IBT 22521 (LJC 609); IBT 21071 (LJC 610) e IBT 21502 (LJC 611; CBS 472.84), y con *P. allii* IBT 26512 (LJC 543), ambas especies citadas como patógenos de aliáceas. *P. allii* es un patógeno específico de ajo (*Allium sativum*), pero puede afectar bulbos de cebolla. Los resultados arrojaron presencia de *P. allii*, pero no presencia de *P. albocoremium*. El predominio del cultivo de ajo en el predio de la EEA de La Consulta podría explicar la presencia de *P. allii* y no *P. albocoremium* en cebollas. Los aislados fueron incorporados a la colección de fitopatógenos de la EEA y estudios moleculares aplicando los genes Beta Tubulina y RNA Polimerasa II se encuentran en ejecución.

GMO 17

### NUCLEOTIDIC VARIABILITY AND PHYLOGENETIC STUDIES OF THE ITS1-5.8S-ITS2 LOCUS IN *Candida tropicalis*

Madrassi L<sup>1</sup>, K. Salvatierra<sup>1</sup>, P. Alvarez Cecco<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Micología "Dra. Martha G. Medvedeff", Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina; <sup>2</sup>Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout", Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.  
Immadrassi@hotmail.com

Fungal barcoding seeks the DNA-borne species identification standardization through the use of gene sequences from annotated reference specimens. Internal transcribed spacer (ITS) regions contained within the nuclear ribosomal repeat unit are one of the most commonly used loci for both species identification and subgeneric phylogenetic inference. This locus is composed of a conserved, intercalary 5.8S gene, and two variable ITS spacers which are often species specific. The nucleotide variability of this locus has been poorly studied except in *Saccharomyces cerevisiae* or *Candida albicans*. The aim of this assay was to explore the intraspecific nucleotidic differences of this locus in *C. tropicalis* and to study this variation from a phylogenetic view. To achieve this 39 reference, clinical-sampled strains sequences from ISHAM Barcoding Database were downloaded, and 330 clinical and environmental samples sequences from NCBI GenBank Database were downloaded as well. *C. parapsilosis* was used as outgroup. Multi-sequence alignments and haplotypes inference were done using DECIPHER and haplotypes R-packages. At least 3 common haplotypes with a frequency >10%, diverging in 1-3 nucleotides, were found to be present in both reference and non-reference sequences. Highlighted, two of them were composed by environmental and clinical samples from different countries, and the other one was composed only by clinical samples from a single country. Moreover, phylogenetic analysis demonstrated that these haplotypes diverge and thereby form different evolutionary branches within *C. tropicalis*.

GMO 18

### *Trichoderma koningiopsis* POS7: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR INFERIDA POR INFORMACIÓN DEL FACTOR DE ELONGACIÓN 1A Y SUS RELACIONES FILOGENÉTICAS

Castrillo M.L.<sup>1</sup>, T.T. Pedrozo<sup>2</sup>, G.Á. Bich<sup>1</sup>, L.L. Villalba<sup>2</sup>, M.C.N. Saparrat<sup>3</sup>, P.D. Zapata<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Recca", Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Argentina; <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Recca", Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Argentina; <sup>3</sup>Instituto de Fisiología Vegetal, INFIVE, CCT CONICET. Universidad Nacional de La Plata. CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Argentina.  
mlc\_827@hotmail.com

El género *Trichoderma* incluye representantes de relevancia tecnológica para la obtención de insumos para el biocontrol, la producción de enzimas y metabolitos con actividad antibiótica. La identificación morfológica de especies en *Trichoderma* es compleja, por lo que la identificación molecular surge como una herramienta promisoría. El Factor de Elongación 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) es un marcador molecular ampliamente utilizado como código de barras genético en hongos y posee un alto poder discriminatorio entre cepas. Se propuso examinar datos de secuencias génicas de EF1 $\alpha$  para la identificación molecular del aislamiento fúngico *Trichoderma* POS7 de interés biotecnológico. A partir de datos genómicos se ensambló la secuencia del EF1 $\alpha$  del aislamiento POS7 utilizando el programa Geneious 9.1. Se utilizaron como referencia secuencias EF1 $\alpha$  de la base de datos Genbank. Se recuperaron secuencias de este gen y se construyeron árboles de relaciones filogenéticas utilizando el programa Mega 5.2. Se obtuvo una secuencia nucleotídica de 747 pb correspondiente al inicio del gen EF1 $\alpha$  de *Trichoderma* POS7. Al comparar esta secuencia nucleotídica con las depositadas en la base de datos del NCBI se obtuvo un 97% de identidad con secuencias reportadas de *Trichoderma koningiopsis* (MK411020 y EU279998). Esta secuencia nucleotídica fue depositada en GenBank bajo el número de acceso MK992911. La información filogenética del gen EF1 $\alpha$  indicó que *Trichoderma* POS7 formó un grupo monofilético con un valor de *bootstrap* de 99% con otras secuencias de *T. koningiopsis*, dentro del clado Viride, en la sección *Trichoderma*.