

HERRAMIENTA MOLECULAR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE ASTAXANTINA (*Phaffia* spp.)

Colabella F¹, D Libkind¹. ¹Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología, INIBIOMA, UNComahue-CONICET.
e-mail: colbellaf@comahue-conicet.gob.ar

Recientemente se ha encontrado que la distribución natural de *Phaffia rhodozyma* y su diversidad genética es mucho mayor de lo que se creía. Esta levadura se explota biotecnológicamente por su exclusiva capacidad de producir el pigmento carotenoide astaxantina de aplicación en acuicultura, además del protector solar micosporina-glutaminol-glucósido. Se dificulta obtener nuevos aislamientos de *Phaffia* por su baja abundancia y la presencia de otras levaduras de apariencia similar y filogenéticamente próximas. Nuestro objetivo fue generar un cebador específico que permita identificar en forma rápida y precisa todos los linajes del género *Phaffia* y excluir a las especies relacionadas con las cuales co-habita. Para esto se diseñó un cebador de 20 nt (PhR) para ser usado en combinación con los cebadores universales ITS3 y NL4, en una amplificación multiplex. Estos cebadores hibridan en la región conservada ITS o D1D2 del ADN ribosomal, generando amplicones de diferentes tamaños (643 pb ITS3-PhR; 1155 pb ITS3-NL4). Se evaluó esta herramienta con siete cepas de *Phaffia* representativas de todos los clados reportados y dos especies del género *Cystofilobasidium* (control negativo). A pesar de su gran diversidad genética, fue posible detectar el amplicón específico para todas las cepas evaluadas, incluso dos posibles especies nuevas del género *Phaffia*. Para las especies control solo se observó el amplicón de 1155 pb. Esto evidencia que el método propuesto presenta la sensibilidad y especificidad requerida para la identificación precisa de aislamientos de levaduras del género *Phaffia*.

GENOTOXICIDAD DE LA BENDAMUSTINA EN CÉLULAS DIPLOIDES DE *Aspergillus nidulans*

Pereira TS, JR Sant'Anna, JF Morais, JPRSA Yajima, MAA Castro-Prado. Laboratorio de Genética de Micro-organismos e Mutagênese. Universidade Estadual de Maringá, Maringá (Brasil).
e-mail: tsuzane@gmail.com

La bendamustina es un agente alquilante utilizado en el tratamiento de diversos tipos de neoplasias, tales como leucemias, linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple. Este antineoplásico induce daños estables en la molécula de ADN, lo que resulta en mecanismos de reparación ineficientes y alteraciones en el ciclo celular. Considerándose la participación de la recombinación mitótica en el desarrollo de neoplasias, el objetivo de este estudio fue investigar el potencial recombinogénico de bendamustina, usando el ensayo de homocigotización y una estirpe diploide heterocigota de *A. nidulans*. Este hongo posee un sistema genético bien caracterizado y sus células pasan gran parte del ciclo celular en la fase G2, en la que ocurre el *crossing over* mitótico. En todas las concentraciones de bendamustina utilizadas (6 µg/ml, 12 µg/mL y 24 µg/mL), se observó un aumento de los valores del índice de homocigotización y homocigosis en genes previamente presentes en heterocigosis. Los resultados de este estudio nos permiten caracterizar la bendamustina como promotora de malignidades secundarias en pacientes con cáncer tratados con este antineoplásico. Financiado por la CAPES.

MARCADORES MICROSATÉLITES PARA *Colletotrichum* sp. AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN FEIJOA

Lopes ME, L Saifert, LJ Borsuk, GG Lombardi, RO Nodari. LFDGV-UFSC.

e-mail: morgana.lopes@hotmail.com

La feijoa (*Acca sellowiana*) una fruta de la Familia Myrtaceae, esta siendo domesticado en su centro de origen. La principal enfermedad de los frutos es la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum* sp. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar una biblioteca enriquecida con microsátélites de aislados de *Colletotrichum* sp. de feijoa. Los micelios de 4 aislamientos del hongo, retirados de frutos colectados en el Estado de Santa Catarina fueron cultivados en el medio papa-dextrosa-agar. El ADN fue extraído y los fragmentos fueron transformados y clonados utilizando *Escherichia coli*, células competentes fueron seleccionadas y multiplicadas en medio de cultivo con ampicilina. Un total de 96 clones fueron secuenciados, 12 regiones que contienen marcadores microsátélites fueron identificados y los *primers* diseñados utilizando el software PRIMER3.1.0. El ADN del hongo fue extraído, cuantificado y diluido a una concentración de 10 ng.μL⁻¹. Las reacciones de PCR fueron realizadas en volumen final de 20 μL, en las siguientes concentraciones: 20 ng de ADN; 1x tampón de NH₄ que contiene MgCl₂; 0,15 mM de cada uno de los dNTP; 0,5 mM de cada cebador y 0,5 U de Taq ADN polimerasa, en el siguiente programa: 95° C durante 2 min; 33 ciclos de amplificación a 95° C por 1 min.; 54° C durante 30 seg.; 72° C durante 1 min y extensión final a 72° C durante 10 min. Los fragmentos de microsátélites amplificados por PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,0%. Siete marcadores de microsátélites fueron amplificados y se utilizarán en las evaluaciones genéticas en feijoa. Financiamiento: CAPES e CNPq.

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Rhizoctonia solani* AG4 HGIII EN SUELO

Taboada G^{1,2}, Y Spedaletti¹, M Aparicio^{1,2}, C Aban^{1,2}, D Cuellar¹, G Orce³, E Harris^{1,2}, G Mercado Cárdenas¹, V Rajal^{4,5}, M Galván^{1,2}, ¹INTA EEA Salta. ²CONICET. ³EEOC, Tucumán. ⁴INIQUI, CONICET. ⁵UNSa. e-mail: giselaboada@gmail.com

En el noroeste Argentino (NOA) el rendimiento del cultivo de poroto se ve afectado por diversas enfermedades fúngicas, entre ellas la podredumbre radicular y mustia hilachosa causadas por *Rhizoctonia solani* (Kühn). La identificación de grupos de anastomosis (AG) es esencial para el conocimiento de la variabilidad patogénica de *R. solani* en la región. El objetivo del trabajo fue realizar la validación geográfica de cebadores específicos y poner a punto la cuantificación del patógeno en suelo mediante PCR en tiempo real. Se utilizó un par de cebadores específicos reportados para identificar *R. solani* AG4-HGIII. La especificidad se constató a través de análisis *in silico* con secuencias ITS obtenidas de aislamientos del patógeno colectados de cultivo de poroto en el NOA. Luego, se puso a punto la PCR en tiempo real para la identificación y cuantificación del hongo en suelo, además se evaluó la presencia de inhibidores del ADN extraído a partir de suelo. Se realizó la inoculación artificial de 10 muestras de suelo estéril con un número creciente de discos de 1 cm. de diámetro de un cultivo puro de 5 días de crecimiento en APG y se incubaron a 25 ± 2° C. A los 15 días se realizó la extracción de ADN y la cuantificación. Los resultados revelaron que los cebadores utilizados son eficientes para la identificación de *R. solani* AG4-HGIII a partir de muestras de suelo. Esta nueva técnica para identificar y cuantificar *R. solani* es rápida y precisa, y será una herramienta útil para futuros estudios de los AG presentes en lotes de cultivo de poroto en la región del NOA.

REPORTE DE CASO: DETECCIÓN TEMPRANA DE GENOMA VIRAL EN ENCEFALOPATÍA POR HSV EN PEDIATRÍA Y EVOLUCIÓN CLÍNICA

Castañeira M¹, E Dezán¹, E Martino¹, M Sosa¹. ¹Laboratorio Biología Molecular. Hospital de Niños "Dr. O. Alassia", Santa Fe, Argentina.

e-mail: marcastaneirao3@hotmail.com

La encefalitis en niños por Virus Herpes Simplex (VHS) es una afección grave de baja incidencia, la mortalidad sin tratamiento es del 70%. Con tratamiento la mortalidad es del 30% y un 28% queda con secuelas neurológicas. Los signos tempranos de compromiso del SNC son fiebre, dolor de cabeza, rigidez de nuca, petequias. La PCR (Reacción de polimerasa en cadena) para VHS en líquido cefalorraquídeo (LCR) es el método de elección por su sensibilidad y especificidad. Presentamos el caso de un niño de 3 meses de edad con síndrome febril sin foco de 3 días de evolución asociado a vómitos y petequias en miembros. Al ingreso en el hospital, se policultivó con resultados negativos, serología pretransfusional, tomografía axial computada, todos negativos. LCR: límpido, incoloro, glucosa: 0,45 g/l, proteínas: 0,86 g/l, leucocitos: 2/mm³. Cultivo sin desarrollo. Tratamiento empírico: ceftriaxona. Se realizó Genoma Viral Herpes 1 y 2 en LCR por PCR anidada para el Gen: Glicoproteína B (UL27) de 148 pb. 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%. Con resultado para VHS 1 y 2 positivo. PCR para otros neurovirus negativas. A las 48 hs se informó y fue tratado con Aciclovir con buena evolución. Alta hospitalaria sin secuelas neurológicas. Esta experiencia ratifica la importancia de disponer en el hospital de técnicas de detección de genoma viral, las que permiten una reducción en el tiempo de entrega de resultados y el aporte a la evolución de los pacientes con encefalopatía.

DETECCIÓN MOLECULAR DE BACTEROIDES Y ADENOVIRUS EN MUESTRAS DE AGUAS DE LA PROVINCIA DE SALTA

Cristobal HA^{1,2}, ME Acevedo¹, HR Poma¹, VB Rajal^{1,3}. ¹Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI-CONICET), Salta.

²Fundación Florencio Fiorini, Buenos Aires, Argentina. ³Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Salta.

e-mail: hacristobal@gmail.com

En Argentina, la legislación establece la detección de indicadores bacterianos para controlar la contaminación microbiana en el agua y los alimentos. Sin embargo, éstos no predicen con precisión la presencia de patógenos humanos que constituyen un riesgo para la salud humana. Los Bacteroides son bacterias prometedoras como nuevos indicadores fecales ya que permite discriminar el origen de la contaminación fecal en fuentes de aguas. El método llamado seguimiento de fuente microbiana se basa en la detección de un marcador genético ADN ribosomal 16S específico del huésped. Los objetivos del presente estudio fueron la detección de Bacteroides y Adenovirus en las aguas de recreo de la provincia de Salta. En el año 2013, se realizó un seguimiento mensual en cuatro puntos del río Arenales, 20 litros de muestras de agua se concentraron 400 veces utilizando el método de ultrafiltración de fibra hueca. Ensayos de PCR en tiempo real se realizaron empleando sistemas Taqman para detectar Bacteroides universales (AllBac) y humanos (BacHum), y Adenovirus a partir de la extracción de ácidos nucleicos de las muestras concentradas. De 44 muestras, 18 y 24 fueron positivas para Bacteroides humanos y universales, respectivamente; y 20 fueron positivas para Adenovirus. Los resultados confirman, que actualmente el río Arenales y sus canales, presentan contaminación fecal (en su mayoría de origen humano) y presencia de virus (Adenovirus). Esto demuestra el potencial del estudio para detectar vertidos ilegales de efluentes domésticos e industriales no tratados que contaminan continuamente el río.