

**Jornadas de Seminarios del Instituto de
Biotecnología y Biología Molecular
(IBBM) 2022**

14 – 16 de diciembre

Libro de resúmenes



CONICET



UNLP

JORNADAS DE SEMINARIOS INSTITUCIONALES 2022

Estimados lectores

El Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) realiza anualmente, desde hace más de diez años, jornadas de seminarios donde se presentan los avances conseguidos en las diferentes líneas de investigación del Instituto. En dichas jornadas, que son abiertas a la comunidad en general, las/los tesinistas y las/los becarias/os (doctorales y postdoctorales) realizan presentaciones sobre los trabajos realizados durante el año a fin de compartirlos con el resto de la comunidad y de promover el intercambio de ideas y el crecimiento conjunto.

El presente libro de resúmenes corresponde a las presentaciones realizadas en las Jornadas de *Seminarios Institucionales* que se llevaron a cabo en la sede de CONICET-CCT-La Plata los días 14, 15 y 16 de diciembre de 2022 con presentaciones que abarcaron áreas de microbiología, virología y biotecnología aplicadas al estudio y mejora de la sanidad agropecuaria y de la salud humana.

A través del presente libro, el IBBM desea compartir con la comunidad los estudios y avances realizados.

Saludo cordial,



Antonio Lagares
Director IBBM

Indice

Cronograma.....	4
Caracterización funcional y estructural del plasmidoma de rizobios empleando <i>Sinorhizobium meliloti</i> como sistema modelo. <i>Abril Lourdes Pagnutti</i>	9
Capacidad inmunomodulatoria de las vesículas de membrana externa derivadas de <i>Bordetella pertussis</i> . <i>Bernarda Pschunder</i>	10
Dinámica de la metilación del DNA y de las histonas, y sus funciones en la remodelación de la cromatina durante reprogramación de la expresión génica en la simbiosis. <i>Milagros Ferrari</i>	11
Caracterización molecular de la cepa P3441 del virus Junín. <i>Pablo Daniel Thomas</i>	12
Estrategias para el mejoramiento de la supervivencia de <i>Ensifer meliloti</i> en preparaciones de bioinoculantes y de su competitividad por la colonización temprana de raíces de alfalfa. <i>Ezequiel G. Mogro</i>	13
Vectores de transmisión de citrus psorosis virus (CpsV). <i>Melina Simeone</i>	14
Vacuna experimental contra <i>Bordetella pertussis</i> : evaluación de inmunización durante la preñez. <i>Oriana López</i>	15
Regulación traduccional en la simbiosis fijadora de nitrógeno. <i>Andrés Eylonstein</i>	16
Regulación de la formación de biofilm en <i>Bordetella bronchiseptica</i> por componentes presentes <i>in vivo</i> . <i>Sabrina Mugni</i>	17
Relación entre el disparo de la respuesta severa y la expresión del sistema de secreción de tipo III en <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> . <i>Delfina Colla</i>	18
Búsqueda de determinantes involucrados en la supervivencia, competencia y simbiosis codificados en el moviloma plasmídico de <i>Sinorhizobium meliloti</i> . <i>Constanza Rey</i>	19
Impacto de la inmunización contra pertussis durante la infancia en la inmunidad inducida por el refuerzo en las gestantes. <i>Pablo Martin Aispuro</i>	20
Modelo murino de inmunosupresión para el estudio de vacunas contra la tos convulsa. <i>Belén Villarroel</i>	21
Selección artificial de ecosistemas para la mejora de inoculantes para soja. <i>Damián Brignoli</i>	22
Estudio de la interacción y regulación del sistema Dtr de un conjunto de plásmidos pertenecientes a una nueva familia MOBQ y el sistema del Mpf de plásmidos conjugativos. <i>Andres Martin Toscani</i>	23
Rol de una proteína dual en la regulación de procesos asociados a c-di-GMP en <i>Bordetella</i> . <i>Federico Zacca</i>	24
Estrategias biotecnológicas para controlar la enfermedad de los cítricos Huanglongbing. Un enfoque dual: edición mediante tecnología CRISPR-Cas9 de genes de susceptibilidad de la planta y silenciamiento de genes esenciales por RNA de interferencia del insecto vector de la enfermedad. <i>Lucrecia Ferreyra Cordero</i>	25
LBD17/29 regula el desarrollo de órganos laterales en raíces de <i>Medicago truncatula</i> . <i>Cristina Kiolinko</i>	26
Mecanismos de tolerancia a la acidez en los rizobios y su relación con la eficiencia en la fijación simbiótica de nitrógeno. <i>Ramiro Rocco Welsh</i>	27
YFV induce estrés del aparato de Golgi y activa a CREB3L1. <i>Silvia Valeria Aquila</i>	28
La asociación fijadora de nitrógeno en la diversidad de leguminosas de interés para la alimentación humana: Estudio <i>in silico</i> de genes simbióticos en poroto, lenteja y garbanzo. <i>Dardo Dallachiesa</i>	29
La ribulosa 1,5-bifosfato caboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) es requerida para la eficiente colonización de la raíz de soja por <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> . <i>Rocío Balda</i>	30
Control transcripcional de la preferencia de cepa en la simbiosis entre <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Rhizobium etli</i> . Rol de GTPasas monoméricas en la simbiosis fijadora de nitrógeno. <i>Cretton Marina</i>	31
Vacuna experimental contra <i>Bordetella pertussis</i> : evaluación de la vía mucosal de inmunización. <i>Erika Susana Rudi</i>	32

Rol de la mitocondria en la infección por el virus Junín. <i>M. Luján Scalise</i>	33
Integración de enfoques experimentales y bioinformáticos para el estudio de interacciones entre bacterias y plantas: La interacción <i>Pantoea-Medicago sativa</i> como modelo de estudio. <i>Sofía Erdozain Bagolin</i>	34
Metilación del RNA y su función en el control de la traducibilidad de mRNAs durante la simbiosis fijadora de nitrógeno. <i>Marianela Cueva Morales</i>	35
Vacunación heteróloga como estrategia preventiva superadora contra pertussis, una enfermedad respiratoria resurgente. <i>Lucía Locati</i>	36
Caracterización de un aislamiento local de <i>Mannheimia haemolytica</i> . <i>Agustin Franchi</i>	37
La localización en cloroplastos de la proteína de movimiento del virus de la psorosis de los cítricos es esencial para ejercer su función de movimiento viral. <i>Ana Marchesini</i>	38

Cronograma

Miércoles 14/12

9:00-9:20

Apertura y presentación a cargo del director del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular.
Dr. Antonio Lagares

Sesión #1. Coordinadora: Dra. María Carla Martini

9:30

Caracterización funcional y estructural del plasmidoma de rizobios empleando *Sinorhizobium meliloti* como sistema modelo.

Abril Lourdes Pagnutti, Laboratorio de Genómica y Ecología Molecular

9:50

Capacidad inmunomodulatoria de las vesículas de membrana externa derivadas de *Bordetella pertussis*.

Bernarda Pschunder, Laboratorio de Vacunas y Salud

10:10

Dinámica de la metilación del DNA y de las histonas, y sus funciones en la remodelación de la cromatina durante reprogramación de la expresión génica en la simbiosis.

Milagros Ferrari, Laboratorio de Biología de Raíz

10:30 - 11:00 Coffee break

Sesión #2. Coordinadora: Dra. María Florencia Ferrer

11:00

Caracterización molecular de la cepa P3441 del virus Junín.

Pablo Daniel Thomas, Laboratorio de Virología Molecular y Patogénesis Microbiana

11:20

Estrategias para el mejoramiento de la supervivencia de *Ensifer meliloti* en preparaciones de bioinoculantes y de su competitividad por la colonización temprana de raíces de alfalfa.

Ezequiel Mogro, Laboratorio de Genómica y Ecología Molecular

11:40

Vectores de transmisión de citrus psorosis virus (CPsV).

Melina Simeone, Laboratorio de Virología y Biotecnología Vegetal

12:00 – 13:40 Almuerzo

Sesión #3. Coordinadora: Dra. María Julia Althabegoiti

13:40

Vacuna experimental contra *Bordetella pertussis*: evaluación de inmunización durante la preñez.

Oriana López, Laboratorio de Vacunas y Salud

14:00

Regulación traduccional en la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Andrés Enrique Eylenein, Laboratorio de Biología de Raíz

14:20

Regulación de la formación de biofilm en *Bordetella bronchiseptica* por componentes presentes *in vivo*.

Sabrina Laura Mugni, Laboratorio de Segundos Mensajeros

14:40 - 15:00 Break

15:00

Relación entre el disparo de la respuesta severa y la expresión del sistema de secreción de tipo III en *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

Delfina Colla, Laboratorio de Interacciones Rizobio-Soja

15:20

Búsqueda de determinantes involucrados en la supervivencia, competencia y simbiosis codificados en el moviloma plasmídico de *Sinorhizobium meliloti*.

Constanza Rey, Laboratorio de Genómica y Ecología Molecular

15:40

Impacto de la inmunización contra pertussis durante la infancia en la inmunidad inducida por el refuerzo en las gestantes.

Pablo Martín Aispuro, Laboratorio de Vacunas y Salud

Jueves 15/12

Sesión #4. Coordinador: Dr. Nicolás Ambrosis

9:00

Modelo murino de inmunosupresión para el estudio de vacunas contra la tos convulsa.

Belén Villarroel, Laboratorio de Vacunas y Salud

9:20

Selección artificial de ecosistemas para la mejora de inoculantes para soja.

Damián Brignoli, Laboratorio de Interacciones Rizobio-Soja

9:40

Estudio de la interacción y regulación del sistema Dtr de un conjunto de plásmidos pertenecientes a una nueva familia MOBQ y el sistema del Mpf de plásmidos conjugativos.

Dr. Andrés Martín Toscani, Laboratorio de Genómica y Ecología Molecular

10:00

Rol de una proteína dual en la regulación de procesos asociados a c-di-GMP en *Bordetella*.

Federico Zacca, Laboratorio de Segundos Mensajeros

10:20 - 10:50 Coffee break

Sesión #5. Coordinadora: Dra. Julieta Fernández

10:50

Estrategias biotecnológicas para controlar la enfermedad de los cítricos Huanglongbing. Un enfoque dual: edición mediante tecnología CRISPR-Cas9 de genes de susceptibilidad de la planta y silenciamiento de genes esenciales por RNA de interferencia del insecto vector de la enfermedad.

Lucrecia Ferreyra Cordero, Laboratorio de Virología y Biotecnología Vegetal

11:10

LBD17/29 regula el desarrollo de órganos laterales en raíces de *Medicago truncatula*.

Cristina Kiolinko, Laboratorio de Biología de Raíz

11:30

Mecanismos de tolerancia a la acidez en los rizobios y su relación con la eficiencia en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Ramiro Rocco Welsh, Laboratorio de Genómica y Ecología Molecular

11:50

YFV induce estrés del aparato de Golgi y activa a CREB3L1.

Dra. Silvia Valeria Aquila, Laboratorio de Virología Molecular y Patogénesis Microbiana

12:10 - 13:50 Almuerzo

Sesión #6. Coordinador: Dr. Ulises Mancini

13:50

La asociación fijadora de nitrógeno en la diversidad de leguminosas de interés para la alimentación humana: Estudio *in silico* de genes simbióticos en poroto, lenteja y garbanzo.

Dardo Dallachiesa, Laboratorio de Genómica y Ecología Molecular

14:10

El virus de la psorosis de los cítricos (CPSV) interfiere con la biogénesis de miRNA en plantas.

Dr. Facundo Ernesto Marmissolle, Laboratorio de Virología y Biotecnología Vegetal

14:30

La ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) es requerida para la eficiente colonización de la raíz de soja por *Bradyrhizobium diazoefficiens*.

Rocio Balda, Laboratorio de Interacciones Rizobio-Soja

14:50 – 15:10 Break

15:10

Control transcripcional de la preferencia de cepa en la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli*. Rol de GTPasas monoméricas en la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Marina Cretton, Laboratorio de Biología de Raíz

15:30

Vacuna experimental contra *Bordetella pertussis*: evaluación de la vía mucosal de inmunización.

Erika Susana Rudi, Laboratorio de Vacunas y Salud

Sesión #7. Coordinador: Dr. Gabriel Robles Luna

9:00

Rol de la mitocondria en la infección por el Virus Junín.

Maria Luján Scalise, Laboratorio de Virología Molecular y Patogénesis Microbiana

9:20

Integración de enfoques experimentales y bioinformáticos para el estudio de interacciones entre bacterias y plantas: La interacción *Pantoea-Medicago sativa* como modelo de estudio.

Sofía Erdozain Bagolin, Laboratorio de Genómica y Ecología Molecular

9:40

Metilación del RNA y su función en el control de la traducibilidad de mRNAs durante la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Marianela Cueva Morales, Laboratorio de Biología de Raíz

10:00 - 10:20 Break

10:20

Vacunación heteróloga como estrategia preventiva superadora contra *pertussis*, una enfermedad respiratoria resurgente.

Lucía Locati, Laboratorio de Vacunas y Salud

10:40

Caracterización de un aislamiento local de *Mannheimia haemolytica*.

Agustin Franchi, Laboratorio de Segundos Mensajeros

11:00

La localización en cloroplastos de la proteína de movimiento del virus de la psorosis de los cítricos es esencial para ejercer su función de movimiento viral.

Ana Marchesini, Laboratorio de Virología y Biotecnología Vegetal

Caracterización funcional y estructural del plasmidoma de rizobios empleando *Sinorhizobium meliloti* como sistema modelo. Abril Lourdes Pagnutti

El conjunto de plásmidos accesorios (y otros elementos móviles) constituye en muchas especies bacterianas un recurso genético diverso, compartido, aunque con funciones—en general—poco caracterizadas, debido a la dificultad de identificar las condiciones ambientales específicas en las que los genes particulares del plasmidoma imprimen a las bacterias una ventaja adaptativa (mejora del fitness).

El objetivo central del presente trabajo de tesis es el estudio del plasmidoma accesorio del rizobio *S. meliloti*, hacia la caracterización de su estructura, plasticidad (tamaño, ordenamiento de genes, redundancia, mosaicos), contenido funcional y perfiles de expresión bajo diferentes condiciones. Pondremos énfasis particular en explorar el rol del plasmidoma en la “vida libre” (no asociativa) y en las etapas más tempranas de la colonización radicular (rizosférica) continuando con estudios previos de nuestro laboratorio. Atendiendo a que posiblemente exista correlación entre los niveles de expresión de los genes del plasmidoma y la calidad en su uso de codones sinónimos, en una primera etapa hemos buscado dentro del plasmidoma (>1,4 Mb hoy disponible) aquellos marcos de lectura que presentaron un uso de codones mejor adaptado al aparato traduccional de *S. meliloti*, estimando para cada gen sus respectivos CAI (*Codon Adaptation Index*) y tAI (*translation Adaptation Index*). Con los genes identificados y empleando transcriptomas disponibles en nuestro laboratorio exploraremos el grado de correlación entre usos de codones sinónimos y nivel de expresión para la información codificada en el plasmidoma donde las formas textuales tienen, en general, un uso de codones de baja calidad. Por otra parte, los genes que ya hemos identificado con valores destacados de CAI y/o tAI son candidatos para los que podremos evaluar su nivel de expresión en medios de laboratorio y en exudados radiculares. En paralelo, y con el propósito de investigar posibles cambios fenotípicos asociados a la presencia de plásmidos particulares, empleando como herramienta un Tn5-mob y rizobios salvajes portadores de plásmidos accesorios, comenzamos a transferir dichos plásmidos a la cepa *S. meliloti* 2011-GFP libre de plásmidos accesorios. Las variantes 2011-GFP portadoras de diferentes plásmidos accesorios, varias de las cuales ya están disponibles, serán comparadas con la cepa control sin plásmidos en sus características de crecimiento en medio rico y mínimo, así como en su capacidad de competir por la colonización de la rizósfera. En los meses que siguen abordaremos el secuenciamiento de los rizobios portadores de los plásmidos transferidos de modo de contar con el contenido génico asociado a los efectos de crecimiento/colonización que puedan observarse. El mapa físico de la colección de plásmidos será asimismo el insumo de entrada para caracterizar la organización, plasticidad y redundancia de información en los diferentes módulos (información general, replicación, movilización) del compartimento plasmídico.

Capacidad inmunomoduladora de las vesículas de membrana externa derivadas de *Bordetella pertussis*. Bernarda Pschunder

La inmunización con vacunas preventivas es una estrategia costo-efectiva que ha permitido y permite reducir de manera significativa la morbi-mortalidad asociadas a un importante número de enfermedades infecto contagiosas. El éxito de esta estrategia requiere de vacunas seguras y eficaces y también de altas coberturas de vacunación. Alcanzar estas coberturas representa para el sistema de salud un desafío logístico de magnitud que ha logrado reducirse gracias al empleo de vacunas combinadas capaces de proteger contra distintas enfermedades al mismo tiempo.

Nuestro laboratorio se ha abocado al estudio de la interacción patógeno-huésped para el agente causal de la enfermedad resurgente pertussis (*Bordetella pertussis*), llegando al desarrollo una plataforma vacunal basada en las vesículas de membrana externa (OMVs) segura y eficaz. Considerando la importancia de contar con formulaciones vacunales combinadas, nos propusimos profundizar el estudio de las OMVs en su capacidad como adyuvante e inmunomodulador de la respuesta inmune. Empleamos para ello el modelo murino con esquemas de 2 dosis y 2 dosis más un refuerzo ya puesto a punto en el laboratorio. Con este modelo evaluamos formulaciones vacunales conteniendo a las OMVs derivadas de *B. pertussis* (OMVBp) y también las de *Escherichia coli* (OMVEc) en combinación con distintos inmunógenos heterólogos. En particular, combinamos a las distintas OMVs con los toxoides tetánico, diftérico y con la proteína spike del SARS-CoV-2. Como controles empleamos formulaciones conteniendo a los inmunógenos heterólogos solos o en combinación con un adyuvante ya licenciado (aluminio). La respuesta humoral inducida por los distintos esquemas fue evaluada mediante ensayos de ELISA. Detectamos así que los niveles de IgG específicos para cada uno de los inmunógenos heterólogos ensayados fueron significativamente superiores en los animales inmunizados con las formulaciones que contenían aluminio o a las OMV tanto de *B. pertussis* como de *E.coli* ($p < 0.0001$). Respecto de los niveles de IgG1 (marcador perfil Th2) observamos que tanto las formulaciones que contienen a OMVBp, OMVEc o aluminio indujeron los mayores títulos ($p < 0.05$). Respecto a los niveles de IgG2a (marcador perfil Th1) detectamos que las formulaciones que contienen a las OMVs pero no las que contienen aluminio inducen un aumento significativo en los títulos con respecto a las formulaciones con los inmunógenos solos ($p < 0.05$). Los ensayos de avidéz empleando distintas concentraciones de tiocianato mostraron que los sueros de los animales tratados con las formulaciones que contiene a las OMVs o aluminio resultan de mayor afinidad que los inducidos en las formulaciones carentes de ambas sustancias. Más aún, los sueros de animales inmunizados con OMVBp mantienen la capacidad de inducir la muerte del patógeno *B. pertussis* por complemento. En conjunto estos resultados muestran que las OMVs presentan no sólo capacidad adyuvante sino moduladora hacia un perfil del tipo Th1.

Dinámica de la metilación del DNA y de las histonas, y sus funciones en la remodelación de la cromatina durante reprogramación de la expresión génica en la simbiosis. *Milagros Ferrari*

Las plantas leguminosas establecen una relación simbiótica con bacterias del suelo, conocidas como rizobios. Esta asociación conduce a la formación de un nuevo órgano post-embrionario en la raíz denominado nódulo, donde los rizobios se alojan y reducen el nitrógeno atmosférico a formas asimilables por el metabolismo de la planta. La formación de nódulos funcionales depende de la activación de los programas morfogénicos de organogénesis del nódulo y de infección bacteriana, la cual va acompañada de una dramática reprogramación de la expresión génica de las células que participan en la simbiosis. Esta reprogramación de la expresión es regulada a varios niveles, desde la remodelación de la cromatina que media la activación transcripcional hasta la síntesis de proteínas y sus modificaciones post-traduccionales. Estudios previos, en nuestro laboratorio, sobre la simbiosis en la leguminosa modelo *Medicago truncatula* revelaron que los cambios a nivel traduccional de los mRNAs pre-existentes contribuyen significativamente a la reprogramación de la expresión génica durante la simbiosis. Entre los mRNAs regulados selectivamente a nivel traduccional, se encontraron mRNAs que codifican proteínas involucradas en la metilación del DNA (RDM4, RNA directed DNA methylation 4) y en la modificación post-traduccionales de histonas, (MtPKDM9b putative Lysine specific demethylase). En este doctorado nos proponemos dilucidar los mecanismos moleculares mediados por metilación del DNA y modificación de histonas que afectan el estado de compactación de la cromatina, contribuyendo así a la reprogramación transcripcional de la expresión génica durante la simbiosis fijadora de nitrógeno. Analizando la expresión de RDM4 y MtPKDM9b en diferentes estadios de la simbiosis y su dependencia respecto de la vía de la nodulación. A demás también nos proponemos dilucidar la función de RDM4 y MtPKDM9b en los procesos de infección bacteria y organogénesis del nódulo. Luego, buscaremos caracterizar los cambios en el estado de metilación del DNA que ocurren como consecuencia de la infección rizobiana y su dependencia respecto de RDM4. Se analizarán también los cambios en el estado de metilación de histonas durante la simbiosis y la influencia de MtPKDM9B sobre dichos cambios. Por último, se correlacionarán los cambios en el estado de metilación del DNA y de histonas con los cambios en las regiones accesibles de la cromatina. Estos resultados permitirán comprender en mayor profundidad los mecanismos moleculares que median la reprogramación transcripcional de la expresión génica durante la nodulación, a la vez que posibilitarán la identificación de genes de interés agronómico para establecer programas de mejoramiento del proceso de fijación biológica de nitrógeno. En esta ocasión voy a presentar resultados relacionados con MtPKDM9B, la cual tiene dos isoformas de splicing alternativo que muestran una regulación diferente en el traductoma de *Medicago truncatula* frente a la inoculación con *Sinorhizobium meliloti*.

Caracterización molecular de la cepa P3441 del virus Junín. *Pablo Daniel Thomas*

El virus Junín (JUNV) es el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, una enfermedad endémica de la pampa húmeda coincidente con el hábitat de su reservorio, el ratón maicero (*Calomys musculinus*). JUNV es un *mammarenavirus* de simetría helicoidal con un diámetro de 70-120 nm compuesto por 6 proteínas, una envoltura lipídica y un genoma de casi 11 Kb conformado por dos moléculas de ARN monocatenario denominadas L y S de polaridad negativa. Cada una de estas moléculas codifican dos genes dispuestos en sentidos opuestos y una región intergénica estable. Mientras L codifica la ARN polimerasa ARN dependiente (L) y la proteína de matriz (Z), S codifica el precursor de la glicoproteína (GPC) y la proteína de nucleocápside (N). GPC se procesa postraduccionalmente para dar las glicoproteínas de virión maduro G1, G2 y su péptido señal estable (SSP). En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó que existen diferencias significativas en modelos in vitro entre la cepa patogénica 3441 (P) comparada con la cepa vacunal atenuada Candid 1 (C#1), incluyendo diferente modulación de apoptosis en células dendríticas plasmacitoides y la expresión diferencial de receptores de la vía TAM. Si bien se conoce la secuencia genómica de C#1, se desconoce la de P. Con el objetivo de conocer más en profundidad las bases moleculares de estas diferencias, se planificó la secuenciación de la cepa P a fin de poder realizar un análisis comparativo con la secuencia conocida de C#1. Para ello, se generaron fragmentos superpuestos por RT-PCR utilizando primers basados en la secuencia de C#1. A la fecha, se ha logrado secuenciar el genoma de P y se han podido realizar múltiples alineamientos y comparaciones, tanto entre las secuencias genómicas como de proteínas virales entre diferentes cepas y especies. La mayoría de las relativamente pocas diferencias entre la secuencia de P y C#1 fueron también encontradas en las secuencias de otras cepas patogénicas sugiriendo que estas podrían ser determinantes moleculares de patogenicidad. Adicionalmente, se ha llegado a clonar las proteínas N, GPC y Z en vectores de expresión en células animales, teniendo a nuestra disposición las proteínas recombinantes de Z y N de JUNV con fluoróforos amino-terminales y se han comenzado experimentos de transfección para conocer algunas de las propiedades biológicas de estas proteínas.

Con el objetivo de profundizar el estudio de las diferencias entre cepas, durante el próximo año se ha planeado clonar la proteína L de JUNV para su expresión en células animales y se continuará con experimentos que nos permitan seguir conociendo las propiedades biológicas de dichas proteínas y eventualmente, aclarar cuál/cuáles proteínas serían responsables de las diferencias biológicas observadas previamente.

Estrategias para el mejoramiento de la supervivencia de *Ensifer meliloti* en preparaciones de bioinoculantes y de su competitividad por la colonización temprana de raíces de alfalfa.

Ezequiel G. Mogro

En agricultura es común el uso de biofertilizantes como alternativa a la fertilización química, dado al impacto ambiental que genera esta última. Los rizobios son α - y β -Proteobacterias con la capacidad de fijar N_2 como amonio cuando están asociados simbióticamente con raíces de plantas leguminosas. Si bien la fijación de nitrógeno se produce en estructuras radiculares especializadas (nódulos fijadores de nitrógeno), estas bacterias también tienen una etapa de vida libre en la que se hallan en mayor concentración en la rizósfera, definida como el volumen de suelo afectado directamente por las raíces de las plantas. La existencia en el suelo de cepas nativas que presentan una mayor competitividad y menor capacidad de fijación de nitrógeno disminuye en muchos casos la eficiencia de los inoculantes. Por lo que es importante enfocar el estudio tanto en el desarrollo del conocimiento de los mecanismos que actúan en etapas tempranas de la interacción con la raíz, como en el desarrollo de productos comerciales que preserven en los microorganismos un fenotipo de competición por la colonización radicular y maximicen su supervivencia en sus formulaciones. Para esto, en nuestro laboratorio disponemos de una biblioteca de mutantes de *E. meliloti*, un rizobio capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas, entre las que se encuentra *Medicago sativa* que es utilizada como planta modelo en nuestros estudios. Estos mutantes fueron generados mediante la técnica de mutagénesis etiquetada por firmas (STM, *Signature Tagged Mutagenesis*), por lo que cada uno lleva una marca genética que permite identificarlo y cuantificarlo en ensayos realizados con mezclas de mutantes, mediante el uso de técnicas de secuenciación masiva.

En este contexto, se seleccionaron 10 cepas de un subgrupo de estos mutantes que, en los ensayos STM, mostraron un fenotipo alterado en la competencia por la colonización rizosférica y en la sobrevivencia en formulaciones de inoculantes tipo turba y líquidos. Estos mutantes fueron nuevamente evaluados en su comportamiento frente a la cepa salvaje *E. meliloti* 2011 de forma individual en plantas inoculadas con la cepa salvaje y mutante en proporción 1:1, donde en muchos casos se mantuvo el comportamiento observado en los ensayos STM. Para continuar con la caracterización de los genes afectados en los mutantes seleccionados nos propusimos evaluar el efecto de su complementación en las cepas mutantes y la sobreexpresión en la cepa salvaje en la competitividad por la colonización radicular mediante la incorporación de plásmidos (pSRK-Gm) que cuenten con las secuencias codificantes y promotoras de los genes estudiados, para los que se observó una mayor capacidad de colonización. Ahora nos proponemos determinar el patrón temporal de su expresión a lo largo de la colonización y evaluar diferentes condiciones *in vitro* que generen un estado inducible de alta competitividad por la colonización rizosférica y la ocupación de nódulos.

Vectores de transmisión de citrus psorosis virus (CpsV). *Melina Simeone*

Citrus psorosis virus (CPsV) es el miembro tipo de la familia Aspiviridae, constituida por 7 miembros de los cuales 6 son transmitidos por el hongo de suelo *Olpidium spp.*, indicando a este hongo como probable transmisor de la enfermedad. En este trabajo de tesis se evaluó la capacidad de las raíces de diversos cítricos de adquirir *Olpidium virulentus* y la del hongo de adquirir y transmitir CPsV. Existen viejos reportes que indicarían que la enfermedad psorosis de los cítricos, causada por CPsV, se transmite naturalmente por un vector del tipo insecto alado. Esas publicaciones presentan experimentos realizados en Argentina y Estados Unidos, sugiriendo un insecto picosuctor como vector del virus. En este trabajo se evaluó la capacidad de adquirir y transmitir CPsV de dos especies distintas de áfidos, *Toxoptera citricida* y *Aphis gossypii*.

Actualmente el método de diagnóstico de psorosis para la certificación de plantas cítricas utilizado es el *indexing* biológico (IB). Este método consiste en inocular plantas sensibles al virus con tejido de las plantas que se desea diagnosticar y observar síntomas a lo largo de varias brotaciones de las plantas sensibles. Este método demora dos años en arrojar resultados, retrasando principalmente la certificación de plantas semilleras y el ingreso al mercado de nuevas variedades. En este trabajo se evalúa la detección de CPsV mediante la técnica de RT-qPCR, comparando sus resultados con los del IB. En total se evaluaron 582 muestras obteniendo una concordancia entre métodos casi perfecta. También se evaluó la sensibilidad y especificidad de la técnica de RT-qPCR.

Vacuna experimental contra *Bordetella pertussis*: evaluación de inmunización durante la preñez. Oriana López

Pertussis es una enfermedad respiratoria inmunoprevenible causada por *Bordetella pertussis* que ha resurgido en los últimos años. Para mejorar el control de la nueva situación epidemiológica se ha incorporado en varios países, incluido el nuestro, la vacunación en gestantes. Esta estrategia busca proteger a los recién nacidos (RN) a través de la protección de su principal fuente de infección (madre) y la transferencia pasiva de anticuerpos específicos. Los datos epidemiológicos recopilados en terreno confirman la efectividad de la estrategia en la prevención de la muerte en RN. Sin embargo, la detección de una posible interferencia de la inmunidad materna transferida en la inducción de la respuesta inmune por la vacunación infantil llevó a que las investigaciones se focalizaran al estudio de este fenómeno. El uso de una vacuna a subunidades con pocos inmunógenos en alta concentración en las gestantes parece inducir altos títulos de anticuerpos maternos que al transferirse afectarían la diferenciación de las células B de los centros germinales del lactante. En este contexto, una formulación con múltiples epitopes podría ser una alternativa. Nuestro laboratorio diseñó y caracterizó en ensayos preclínicos un candidato vacunal multiepitope basado en vesículas de membrana externa (OMVsBp). Para su uso durante la gestación es necesario direccionar la respuesta inmune inducida hacia un perfil Th2. Con este objetivo caracterizamos formulaciones basadas en OMVsBp que presentan cambios en la cantidad y/o estructura del LPS de forma de reducir su impacto en el direccionamiento hacia el perfil Th1. Así, obtuvimos y caracterizamos OMVs derivadas de las cepas Tohama-PagL (OMVPagL) y Tohama $\Delta arnT$ (OMV $\Delta arnT$) con modificaciones en la estructura del lípido A. A partir de estas OMVs empleando el modelo murino evaluamos inmunogenicidad y capacidad protectora de las mismas en comparación con las OMVwt. Respecto de la respuesta inmune humoral, detectamos que los niveles de IgG inducidos por las OMV $\Delta arnT$ fueron significativamente menores a los inducidos por OMVwt ($p < 0,05$); observándose también menores niveles de IgG1 (marcador Th2). Respecto de los niveles IgG2a (marcador Th1), los inducidos por OMV $\Delta arnT$ y OMVPagL resultaron significativamente menores a los inducidos por la OMVwt. Interesantemente, al aumentar la dosis de OMVPagL los niveles de IgG1 aumentaron sin incrementar los niveles de IgG2a. Al evaluar la capacidad protectora en el modelo con desafío intranasal todas las formulaciones mostraron niveles adecuados de protección en pulmón respecto al grupo control no inmunizado ($p < 0,05$) pero las OMV $\Delta arnT$ confirieron menor protección. Las OMVPagL evitaron además la colonización bacteriana en la cavidad nasal de manera más eficiente que las OMVwt. Esta capacidad se incrementó al emplear una dosis mayor de OMVPagL (reducción de la colonización en 2.5 órdenes). Los resultados hasta aquí alcanzados posicionan a las OMVPagL para su uso modelo murino de preñez.

Regulación traduccional en la simbiosis fijadora de nitrógeno. *Andrés Eylestein*

El nitrógeno es uno de los principales limitantes para el crecimiento de las plantas en la producción agrícola. La fijación biológica de nitrógeno ha sido usada en la agricultura para solucionar esta problemática, introduciendo cepas de rizobio optimizadas para la fijación de nitrógeno en el cultivo de leguminosas. Sin embargo, mecanismos de selección de cepa presentes en la planta pueden limitar la eficiencia de este proceso. Una de las líneas de investigación en nuestro laboratorio se ha enfocado en dilucidar las bases genéticas que permiten a las leguminosas la selección de cepas de rizobios más eficientes en el contexto de la simbiosis fijadora de nitrógeno. Para estudiar la contribución del nivel de regulación traduccional a las respuestas específicas de cepa usaremos la técnica de TRAP (*Transalting Ribosome Affinity Purification*) seguida de secuenciación masiva para analizar cambios en los niveles de transcriptos asociados a la maquinaria traduccional. Se generó una construcción que permite expresar la proteína ribosomal L18 de *Phaseolus vulgaris* fusionada al epítopo FLAG bajo el control del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Esta construcción fue utilizada para generar plantas compuestas, con parte aérea *wild tipe* y raíces transgénicas mediante transformación por *Agrobacterium rhizogenes*. Se analizó la integración del T-DNA al genoma de la planta por PCR con *primers* específicos del transgén y la expresión de la proteína PvRPL18 por *western blot* usando anticuerpos comerciales anti-FLAG. Se generarán también construcciones que expresen L18 bajo el control de promotores específicos de córtex y de epidermis para estudiar los cambios traduccionales en los tejidos en que se desarrollan la organogénesis del nódulo y la infección.

Otra línea de investigación de nuestro laboratorio se centra en el rol de las GTPasas monoméricas en la simbiosis fijadora de nitrógeno. Las GTPasas monoméricas son proteínas regulatorias presentes en el genoma de todos los eucariotas que han sido implicadas en diversos procesos celulares, como el tráfico intracelular mediado por vesículas, la modulación de señales disparadas por receptores y la organización del citoesqueleto. Se sabe que en *Arabidopsis thaliana* la GTPasa monomérica ROP2 está involucrada en la vía de reiniciación de la traducción de mRNAs con *upstream* ORFs (uORFs) en respuesta a auxina. En los últimos años hemos trabajado en caracterizar la función de esta GTPasa en el contexto de la nodulación mediante técnicas de genética reversa. Para tal fin generamos plantas con niveles reducidos de ROP2 y plantas que expresan versiones mutantes constitutivamente activas (CA) o dominantes negativas (DN), sobre las cuales realizamos estudios fenotípicos de la organogénesis del nódulo y el proceso de infección.

Regulación de la formación de biofilm en *Bordetella bronchiseptica* por componentes presentes *in vivo*. Sabrina Mugni

Bordetella bronchiseptica (Bb) es un patógeno respiratorio capaz de infectar un gran número de huéspedes. Nuestro grupo describió que el segundo mensajero c-di-GMP (cdG) regula la movilidad, la formación de biofilm y la patogénesis en esta bacteria. Los niveles de cdG están regulados por la actividad de diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas (PDE), encargadas de su síntesis y degradación respectivamente. Altos niveles de cdG están relacionados con alta formación de biofilm, mientras que los bajos niveles con presencia de movilidad.

Previamente demostramos que Bb forma menos biofilm en presencia de albúmina y calcio (BSACa), ambos componentes de las secreciones del tracto respiratorio. A su vez, la formación de biofilm es importante para la colonización de Bb. Por lo tanto, resulta importante profundizar en el entendimiento del mecanismo por el cual factores externos presentes en el huésped modulan la formación de biofilm. La adhesina hemaglutinina filamentosa (FHA) interacciona físicamente con la toxina adenilato ciclasa (AC), dando como resultado una disminución en la formación de biofilm. Por otro lado, está descrito que en presencia de BSACa los niveles de secreción de AC aumentan, lo que implica que la presencia de BSACa disminuiría la formación de biofilm. Para evaluar esta hipótesis realizamos ensayos de formación de biofilm de las cepas WT, *BbΔfhaB* y *BbΔcyaA* con o sin BSACa y obtuvimos como resultado que *BbΔcyaA* es insensible al agregado de BSACa.

Previamente hemos determinado que los niveles de cdG disminuyen en presencia de BSACa. Por lo tanto, hipotetizamos que alguna PDE podría estar regulando la disminución de biofilm. Para evaluar esto, construimos mutantes de las PDE presentes en Bb y realizamos ensayos de formación de biofilm en medio con BSACa. Los ensayos de formación de biofilm de los mutantes simples no mostraron diferencias con BSACa. Estamos construyendo el mutante quántuple, pero observamos que el mutante quádruple forma más biofilm que la cepa WT con el agregado con BSACa.

Como parte de la evaluación del rol de las PDE nos enfocamos en BB3116, que tiene un dominio CSS descrito como sensible a cambios redox. Primero la expresamos en *E. coli* S17-1 y evaluamos movilidad y biofilm. La cepa que expresa *bb3116* forma menos biofilm y se mueve más que la cepa control, como es esperable para una PDE activa. De acuerdo a esa actividad, la sobreexpresión de *bb3116* en Bb estimula la movilidad y su delección la inhibe. Inesperadamente, observamos que la cepa *BbΔbb3116pV* forma menos biofilm que la cepa WTpV, al contrario de lo que esperábamos. En concordancia con estos resultados las micrografías de fluorescencia mostraron que a las 5 h de crecimiento, la cepa WT ya tiene cúmulos de células, mientras que el mutante únicamente tiene células adheridas aisladas. Finalmente evaluamos si BB3116 responde a estrés redox. Realizamos ensayos de movilidad y de formación de biofilm con y sin el agregado del agente reductor DTT, pero no vimos diferencias.

Relación entre el disparo de la respuesta severa y la expresión del sistema de secreción de tipo III en *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Delfina Colla

Bradyrhizobium diazoefficiens es una bacteria del suelo que reduce el N₂ atmosférico en simbiosis con plantas de soja. La genisteína, flavonoide que se exuda en las raíces de esta planta, induce la expresión del Sistema de Secreción de Tipo 3 (T3SS) mediante la expresión del regulador TtsI. TtsI promueve la expresión de los genes estructurales como el gen *rhcJ* y las proteínas efectoras conocidas como Proteínas Externas de Nodulación (Nops), implicadas en la supresión de las defensas del huésped. Asimismo, la inducción del T3SS se ve afectada, también, por las variaciones del segundo mensajero, guanosina tetra/pentafosfato, (p)ppGpp, que se sintetiza en bacterias en respuesta al estrés a través de la denominada respuesta severa (SR). La SR induce un cambio metabólico global que resulta en la adaptación de la bacteria a las nuevas condiciones. En rizobios el segundo mensajero se sintetiza e hidroliza por una proteína bifuncional llamada Rsh. Un mutante *rsh* de *B. diazoefficiens*, incapaz de producir (p)ppGpp, en presencia de genisteína no indujo la expresión del *ttsI* ni del gen estructural *rhcJ*, cuando la cepa salvaje sí. Además, el mutante induce los niveles del transcripto *GmPR1*, relacionado con la patogénesis de la planta. En nuestro laboratorio se descubrió que la inanición de N en el medio de cultivo bacteriano hace a los rizobios más infectivos frente a la soja en comparación con una condición de suficiencia de N. Esta es una condición donde probablemente se dispare la SR y se aumenten los niveles de (p)ppGpp. Así, nuestra hipótesis de trabajo es que *B. diazoefficiens* USDA 110, en condiciones de escasez de nutrientes en las que se estimula la interacción simbiótica, aumenta los niveles de (p)ppGpp. Esta respuesta prepara a los rizobios para la interacción simbiótica, aumentando su eficiencia a través de la regulación del T3SS.

Para estudiar y poner de manifiesto la SR realizamos la extracción de proteínas totales de *B. diazoefficiens* USDA 110 y del mutante *rsh* en condiciones: tratada con solución mineral libre de C y N (T), en las que se activa la SR, y no tratada (U). Se realizaron comparaciones entre cepas y condiciones buscando proteínas diferencialmente expresadas. Con el fin de encontrar determinantes que relacionen la SR y el T3SS se hizo una exoproteómica de ambas cepas inducidas con genisteína (G) o sin inducción (WI). El análisis comparativo de las distintas situaciones metabólicas mostró que los efectos del estrés y la inducción del T3SS se lograron en ambas proteómicas. Para evaluar si existe una relación entre la expresión del T3SS y el estrés nutricional en *B. diazoefficiens*, medimos por qRT-PCR los niveles relativos de transcripto de *ttsI* y *rhcJ*, en cultivos G y otros T. Reafirmamos que la genisteína produce un aumento en la expresión de estos genes. Pero, novedosamente en *B. diazoefficiens* USDA 110, el estrés nutricional los indujo aún más, confirmando así una estrecha relación entre el (p)ppGpp y la expresión del T3SS.

Búsqueda de determinantes involucrados en la supervivencia, competencia y simbiosis codificados en el moviloma plasmídico de *Sinorhizobium meliloti*. Constanza Rey

Los rizobios son bacterias de suelo capaces de establecer una relación simbiótica con plantas leguminosas. A través de la fijación biológica de nitrógeno, las bacterias transforman el nitrógeno molecular en compuestos nitrogenados asimilables por la planta y a su vez, reciben carbohidratos. Dicho proceso es importante a nivel económico y ecológico, ya que permite prescindir de fertilizantes nitrogenados costosos y contaminantes. Uno de los rizobios más estudiado es *Sinorhizobium meliloti*, simbiote de la alfalfa (*Medicago sativa*). Una característica general del genoma de *S. meliloti* es la presencia de al menos tres replicones grandes: un cromosoma y dos megaplásmidos denominados en la cepa modelo 1021 pSymA y pSymB. Estos plásmidos contienen los genes necesarios para establecer un estado simbiótico completo. Además, algunas cepas de *S. meliloti* presentan plásmidos accesorios, que poseen tamaños variables y contienen genes con funciones desconocidas. Según estudios previos, se determinó que los plásmidos tipo pSymA y los plásmidos accesorios son los elementos responsables de la diversidad genética entre las distintas cepas. Por lo tanto, mi trabajo de tesis se enfocará en el estudio de la contribución de los plásmidos tipo pSymA y de los plásmidos accesorios de distintas cepas de *S. meliloti* a la expresión de características específicas de la vida saprofítica y del comportamiento simbiótico de la bacteria. El primer objetivo consiste en caracterizar funcionalmente los plásmidos simbióticos tipo pSymA provenientes de distintas cepas de colección. Para eso, buscamos en base de datos las secuencias de genomas disponibles de las cepas de *S. meliloti*, siendo un total de 258 (a 06/22). Del total, solo seleccionamos 27 pSymAs de aquellas cepas que tenían su secuencia genómica cerrada. Inicialmente, nos propusimos caracterizar las 27 secuencias en base al pangenoma y los genes *core*. Con esta información se realizaron árboles filogenéticos, a partir de los cuales definimos 7 grupos. Además, buscamos los genes asociados a conjugación, encontrándose en 10 pSymAs un nuevo sistema de conjugación diferente al descrito en trabajos previos. Por otro lado, para determinar si la presencia de alguno de los pSymA le otorga al rizobio portador ventajas respecto a la simbiosis, supervivencia o competencia, los pSymA fueron marcados y transferidos a una cepa de *S. meliloti* Sma818 (curada del pSymA). Luego, realizaremos ensayos en alfalfa para determinar la eficiencia simbiótica de las cepas quiméricas y también, se evaluará competitividad para la nodulación y supervivencia en distintos tipos de suelos. Finalmente, estudiaremos los plásmidos accesorios presentes en las 27 cepas de *S. meliloti* seleccionadas, con el fin de analizar si portan genes para la competencia y para la promoción del crecimiento vegetal.

Impacto de la inmunización contra pertussis durante la infancia en la inmunidad inducida por el refuerzo en las gestantes. Pablo Martín Aispuro

La vacunación masiva contra pertussis en los años 50 redujo drásticamente la mortalidad asociada a esta enfermedad respiratoria. El resurgimiento de la enfermedad en los últimos años obligó a la introducción de refuerzos. Las vacunas acelulares (aP) de segunda generación posibilitaron el uso de refuerzo en grupos poblacionales que por su edad no pueden recibir la tradicional vacuna a células enteras (wP). Recientemente los mismos fueron incorporados en mujeres gestantes con el objetivo de proteger a los recién nacidos que representan la población más vulnerable a la enfermedad. Los datos recopilados al presente sobre el uso de esta estrategia confirman la efectividad de esta estrategia en prevenir enfermedad severa y muerte en recién nacidos y lactantes que por su edad no pueden ser inmunizados. En la actualidad se está debatiendo la implicancia de la vacunación primaria durante la infancia con wP vs aP en la inmunidad generada por los refuerzos, en particular en el refuerzo en las gestantes y las consecuencias de la misma en los recién nacidos. Para generar evidencia al respecto empleamos el modelo murino de preñez ya puesto a punto en nuestro laboratorio. Trabajamos con esquemas que incluyen una dosis de aP durante el embarazo (aPpreg), sobre esquemas primarios de dos 2 dosis con wP o aP resultando esquemas maternos wP-wP-aPpreg o aP-aP-aPpreg. Evaluamos la respuesta inmune transferida y su capacidad protectora contra el desafío de *B. pertussis* en la descendencia nacida a distintos tiempos luego la dosis aPpreg. Estos ensayos nos permitieron detectar que la inmunidad transferida a las crías con cualquiera de los planes de inmunización maternos ensayados lograron reducir la colonización bacteriana en pulmones a niveles muy bajos (reducción 5-6 órdenes respecto de crías sin inmunidad materna, $p < 0,001$). La inmunidad adquirida por la vacunación wPwPaPpreg otorgó protección a la descendencia en todos los embarazos hasta 22 semanas después de recibir la dosis aPpreg. Más aún, la inmunidad transferida no afectó la inducción de la inmunidad por dosis neonatales. La capacidad protectora en las crías nacidas de madres con esquema aPaPaPpreg comenzó a disminuir en los nacimientos que ocurrieron luego de 10 semanas después de recibir la dosis de aPpreg. Esta pérdida en la capacidad protectora no pudo ser superada con la aplicación de dosis neonatales. Para estas crías los niveles totales de IgG anti-Bp fueron más bajos en comparación con los detectados en crías nacidas de madres wPwPaPpreg ($p < 0,05$). En ellas los niveles IgG1 resultaron de mayor magnitud que los de IgG2a. Por su parte las crías nacidas de madres con wPwPaPpreg exhibieron una relación IgG2a/IgG1 cercana a 1 (mayor perfil Th1). Este perfil de Th1 se confirmó mediante la evaluación de los niveles de INF γ . En suma, los resultados presentados aquí sostienen que la inmunización primaria con wP impacta positivamente en la inmunogenicidad y en la duración de la capacidad protectora de las crías.

Modelo murino de inmunosupresión para el estudio de vacunas contra la tos convulsa.

Belén Villarroel

Los individuos con inmunocompromiso tienen mayor riesgo de presentar una enfermedad grave que puede ser prevenible por vacunación. Esta población debe inmunizarse precozmente, de preferencia antes de que la inmunodeficiencia progrese. Para los niños con tratamiento inmunosupresor hay que elegir el momento más oportuno para vacunar. En algunos casos debe reducirse o suspenderse transitoriamente la terapia inmunosupresora para poder vacunar, aprovechando ese lapso para completar las inmunizaciones pendientes, empleando incluso esquemas acelerados.

Una enfermedad que se agrava en los inmunosuprimidos es pertussis. Para esta enfermedad existen vacunas que han logrado reducir significativamente su morbi-mortalidad. Sin embargo, el resurgimiento de la misma ha marcado la necesidad de mejorar estrategias de vacunación y a desarrollar nuevas vacunas. En relación a este último punto, el desafío reside en lograr vacunas que también sean efectivas para los pacientes con inmunocompromiso. En este contexto, el objetivo general de mi proyecto de tesis es evaluar estrategias de vacunación que incluyan candidatos vacunales noveles en un modelo murino de inmunosupresión. Como primera etapa trabajamos en la puesta a punto de dicho modelo utilizando como droga inmunosupresora ciclofosfamida (CP). Ensayamos la inmunosupresión al momento de la vacunación y también posterior a la misma. Como controles se emplearon grupos de ratones no inmunosuprimidos no inmunizados y ratones inmunizados no inmunosuprimidos. La inmunosupresión fue evaluada mediante recuento de leucocitos. La respuesta inmune humoral inducida por la vacunación fue evaluada mediante ensayos de ELISA. Los resultados alcanzados mostraron que el grupo con inmunosupresión durante las inmunizaciones, presentó la mayor disminución en los niveles de IgG específicos ($p < 0,05$). Respecto de la evaluación de la respuesta celular y capacidad protectora de estos tratamientos primeramente realicé una capacitación en el uso de estas técnicas sumándome al desarrollo de un objetivo de nuestro laboratorio sobre la identificación de cepas de una colección bacteriana caracterizada para la obtención de las OMVs. En particular trabajé con OMVs obtenidas a partir de 5 aislamientos de *B. pertussis*, 2 extranjeros y 3 locales en comparación con la cepa de referencia *B. pertussis* Tohama. A través de estos ensayos, que permitieron mi aprendizaje en el uso de las técnicas, encontramos que tanto los títulos de IgG total como los de isotipos IgG1 e IgG2a/IgG2c resultaron ser superiores para el aislamiento extranjero Bp1917 ($p < 0,05$). Los niveles de IFNg resultaron comparables para las distintas OMVs ensayadas al igual que la capacidad protectora evaluada en esquemas de dos dosis. La funcionalidad y calidad de los anticuerpos para los distintos tratamientos está siendo analizada. Para la presentación oral de este trabajo esperamos contar con estos resultados y los de protección para los ensayos de inmunosupresión.

Selección artificial de ecosistemas para la mejora de inoculantes para soja. *Damián Brignoli*

Algunas cepas de *Bradyrhizobium spp.* son utilizadas ampliamente como inoculantes para el cultivo de soja con el fin de aprovechar su capacidad simbiótica de fijación de N_2 . Sin embargo, la eficiencia de estos inoculantes suele ser baja debido a la competencia que ejercen los rizobios noduladores de esta especie residentes en el suelo. Esto podría deberse a que la inoculación de todos los cultivos de soja con una o unas pocas cepas de élite podría ser una estrategia errónea cuando existen poblaciones autóctonas adaptadas a las condiciones locales. En su lugar, podría explorarse la posibilidad de aumentar la fijación de N_2 aprovechando la capacidad de estas poblaciones del suelo mediante estrategias novedosas que conciban el inoculante como parte de un complejo microbiológico mayor que incorpore microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM). De este modo, iniciamos una selección de ecosistemas artificiales con el objetivo de establecer nuevos consorcios de bacterias del suelo. Para ello, seleccionamos bacterias provenientes de dos suelos: un suelo bajo cultivo de soja inoculado (suelo S), y un suelo prístino, elegido por sus buenas características edáficas y promotoras del crecimiento vegetal (suelo P). Nuestra hipótesis es que las buenas propiedades del suelo P fueron, al menos en parte, modeladas por su microbiota, y por lo tanto, los aislados de este suelo podrían contribuir a mejorar las propiedades del suelo S y al mismo tiempo, el rendimiento de fijación de N_2 de los rizobios noduladores presentes en él. El aislamiento de los microorganismos se llevó a cabo sembrando alícuotas de diluciones seriadas de ambos extractos de suelo en medio de cultivo YEM, TSA y Agar Sabourad, a 28°C y 37°C. Se analizaron propiedades PGPM, como la solubilización de fosfatos, quelado de hierro y producción de AIA y se observó actividad PGPR en 5 géneros. De los 36 aislados, determinamos 8 géneros en el suelo S y 6 géneros en el suelo P. Además, se llevaron a cabo otras pruebas de identificación primaria como catalasa, oxidasa y movilidad y se realizó la secuenciación del gen 16S rRNA para determinar si había especies peligrosas en cada muestra. Los aislados que presentaron mayor identidad con cepas potencialmente riesgosas se descartaron para desarrollos posteriores. Asimismo, se aislaron rizobios noduladores utilizando plantas trampa, y el tamaño de la población en el suelo S se estimó en $7,6 \times 10^3$ rizobios g^{-1} de suelo por el método del NMP. La huella de ADN y la secuenciación del gen 16S rRNA mostraron que los aislados eran *B. elkanii*, mientras otros agruparon con cepas tipo de *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*. En la próxima etapa combinaremos los aislados rizobianos con los grupos de bacterias PGPR de ambos suelos con el objetivo de mejorar los rasgos de fijación de N_2 como la nodulación, masa de nódulos, relación tallo/raíz y contenido de clorofila como primer paso para seleccionar consorcios para el desarrollo de inoculantes de nueva generación.

Estudio de la interacción y regulación del sistema Dtr de un conjunto de plásmidos pertenecientes a una nueva familia MOBQ y el sistema del Mpf de plásmidos conjugativos.
Andres Martin Toscani

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomal procariota de tamaño variable con capacidad autoreplicativa. Estos pueden contener genes para proteínas con funciones plenamente plasmídicas así como módulos accesorios que le confieren al microorganismo huésped alguna ventaja adaptativa. Los plásmidos pueden dispersarse a otros individuos por al menos dos mecanismos de transferencia horizontal de genes: Transformación y Conjugación. La conjugación es un proceso que requiere el contacto directo célula-célula y puede dividirse en tres grandes pasos:

1- Procesamiento: reconocimiento del origen de transferencia (*oriT*, secuencia de ADN donde ocurre el clivaje y transferencia de la hebra) por las proteínas del Dtr (del inglés DNA transfer and replication) y procesamiento del ADN.

2- Reclutamiento: reconocimiento del relaxosoma por la proteína acopladora.

3- Translocación: transporta del complejo proteína/ADNt por el Mpf (del inglés *Mating pair formation*). La proteína más importante del Dtr es la relaxasa, encargada del reconocimiento y unión al *oriT*. Utilizando las secuencias de los 300aa N-ter de las relaxasas es posible clasificarlas dentro de distintas familias.

Las bacterias del género *Acinetobacter* han cobrado relevancia clínica debido a la aparición frecuente de cepas multi/pan resistentes asociadas a infecciones hospitalarias. En estudios previos se caracterizaron 19 plásmidos de una colección de *Acinetobacter* spp. aislados de ambientes intrahospitalarios. El análisis filogenético de las relaxasas de los plásmidos pIH6, pIH7 y pIH16 permitió clasificarlos en una novedosa subfamilia denominada MOBQ4. Aunque la secuencia del N-ter de dichas proteínas mostró alta similitud de secuencia, el extremo C-ter es altamente variable. Los plásmidos llevando las secuencias *mob* resultaron ser movilizables por al menos un plásmido *helper*, aunque las frecuencias de conjugación de una misma construcción al utilizarse distintos plásmidos *helper* fueron variables. Dado que los extremos C-ter tienen alta variabilidad entre las proteínas estudiadas, es posible que sean estos los que interactúen con las proteínas acopladoras de los diferentes sistemas del Mpf generando así una interacción preferencial con uno u otro sistema de conjugación.

En este proyecto nos proponemos estudiar la interacción entre las proteínas asociadas al relaxosoma de plásmidos pertenecientes al nuevo subgrupo MOBQ y las proteínas de acoplamiento pertenecientes a diferentes sistemas de plásmidos *helper*. Asimismo, es de nuestro interés identificar y describir si existe o no una regulación cruzada de la transcripción de genes del Dtr entre este nuevo grupo de plásmidos movilizables y los correspondientes en plásmidos *helper*.

Rol de una proteína dual en la regulación de procesos asociados a c-di-GMP en *Bordetella*.

Federico Zacca

En nuestro grupo de trabajo estamos abocados al estudio del rol del segundo mensajero c-di-GMP en la regulación de fenotipos asociados a la virulencia en el género *Bordetella*. La síntesis y degradación de esta molécula es catalizada por diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (PDE), respectivamente. Estas actividades se asocian a dominios conservados: GGDEF para las DGC y EAL o HD-GYP para las PDE. Sin embargo, no todas las proteínas que presentan estos dominios tienen efectivamente actividad catalítica, ya que esto depende de la conservación de residuos de aminoácidos específicos en el sitio activo. Tal es el caso de la proteína codificada por el gen *bb2109* en *B. bronchiseptica*. Esta es una proteína de membrana que presenta un dominio GGDEF y un dominio EAL, ninguno de los cuales presenta los residuos conservados en el sitio activo, lo que hace improbable que tengan actividad catalítica. Este tipo de dominios GGDEF y EAL llamados “degenerados” han sido propuestos como efectores de c-di-GMP, ya que pueden participar de vías de señalización por retener la capacidad de unir al segundo mensajero o de interactuar con otras proteínas DGC y PDE. Adicionalmente, BB2109 presenta en el C-terminal un dominio histidina quinasa (HK), lo que sugiere que podría formar parte de algún sistema regulatorio mediado por fosforilación.

BB2109 ya ha sido descrita por nuestro grupo de trabajo como un actor importante en la señalización por c-di-GMP en *B. bronchiseptica*. Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que esta proteína podría interactuar específicamente con DGC de membrana para la regulación de la formación de biofilm y/o la movilidad. El análisis de posibles pares interactores nos llevó a plantear una posible interacción funcional entre BB2109 y la DGC BB4664. Para poder evidenciarla, se sobreexpresó BB4664 en diferentes entornos genéticos. En primer lugar, la sobreexpresión de BB4664 en *B. bronchiseptica* salvaje indujo una inhibición de movilidad del 50%, demostrando que esta proteína posee actividad DGC. Sin embargo, la sobreexpresión de BB4664 en una cepa mutante en *bb2109* no produjo cambios en la movilidad, demostrando que existe una dependencia funcional entre BB4664 y BB2109. Seguidamente, nos propusimos evaluar si el dominio HK de BB2109 es importante para la interacción. Para ello, se realizó la sobreexpresión de BB4664 en una cepa que expresa una variante mutada de BB2109 (*bb2109hk-*), lo que arrojó como resultado una inhibición de aproximadamente 20%, demostrando que este dominio podría ser importante una interacción productiva entre este par. Adicionalmente, se realizó el mismo ensayo con una cepa que presenta dentro del dominio HK una mutación en un residuo que podría ser fosforilado *in vivo*, pero no se observaron diferencias. Por último, nos planteamos estudiar el rol del sistema homólogo BP1092-BP0338 (100% de identidad en ambas proteínas) en *B. pertussis*. Para ello, utilizamos un enfoque proteómico para identificar factores que podrían ser regulados por este par.

Estrategias biotecnológicas para controlar la enfermedad de los cítricos Huanglongbing. Un enfoque dual: edición mediante tecnología CRISPR-Cas9 de genes de susceptibilidad de la planta y silenciamiento de genes esenciales por RNA de interferencia del insecto vector de la enfermedad. *Lucrecia Ferreyra Cordero*

Argentina es uno de los principales productores de cítricos a nivel mundial, siendo uno de los cultivos más importantes del país. El Huanglongbing (HLB) es una enfermedad devastadora globalmente que pone en peligro toda la producción y el valor económico de las plantaciones. El agente asociado a la enfermedad es la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), y una vez que el árbol está infectado, no tiene cura. El psílido vector, *Diaphorina citri*, está presente en nuestro país, aumentando el riesgo de dispersión. El presente plan de trabajo apunta a dar una solución sustentable a la inminente pérdida de plantaciones de cítricos por HLB, centrándose en la prevención de la diseminación de la enfermedad. Se proponen dos estrategias complementarias: 1. La edición de genes de susceptibilidad de *Citrus sinensis* (naranja dulce) a la bacteria causante de la enfermedad mediante la tecnología CRISPR-Cas9 y 2. El control del insecto vector *D. citri* Kuwayama, mediante el silenciamiento génico (RNAi) de genes esenciales.

Para la primera estrategia se propone editar un gen de susceptibilidad a HLB previamente reportado, *CsA* del genoma de *Citrus sinensis* así como también otros dos genes de susceptibilidad candidatos: *CsB* y *CsC* mediante el sistema de edición genética CRISPR-Cas9. Se pretenden obtener plantas de naranja dulce editadas y transgénicas resistentes (o tolerantes) a HLB. Para este primer objetivo se han diseñado y seleccionado mediante herramientas bioinformáticas las mejores guías de edición (sgRNAs) para cada uno de los genes de acuerdo a su secuencia, estructura óptima de plegamiento y riesgo de *off-targets*. Se ha comenzado con la generación de construcciones genéticas por un sistema de clonado de tipo *Golden Gate* en dos niveles. El primer nivel que consiste en el clonado de las sgRNAs individuales ha sido completado, mientras que el ensamblaje del segundo nivel, conteniendo la maquinaria CRISPR restante, está en desarrollo.

Para la segunda estrategia se identificarán nuevos genes esenciales de *D. citri* que serán seleccionados mediante estudios bioinformáticos para su silenciamiento específico. Se realizará la síntesis de RNA de doble cadena (dsRNA) de fragmentos de dichos genes y de dos genes control: Dc1 y Dc2, ya ensayados como blancos de RNAi en bibliografía. Se establecerá la cría de *D. citri* y se le administrará dsRNA por vía oral en soluciones o en brotes jóvenes de naranja, esperando producir una mortalidad del psílido suficiente para disminuir la transmisión de CLas. En cuanto a este objetivo se ha clonado un fragmento del gen Dc1 en un vector bajo el control del promotor T7 a partir de muestras de RNA de *D. citri*. Se continuará con la transcripción *in vitro* e hibridación de ambas hebras del dsRNA para su posterior utilización en los bioensayos.

LBD17/29 regula el desarrollo de órganos laterales en raíces de *Medicago truncatula*.

Cristina Kirolinko

El microRNA390 (miR390) tiene como transcripto target el transcripto trans-acting RNA3 (TAS3), a partir del cual se forman pequeños RNAs que actúan en trans (tasiRNAs), pequeños RNAs que actúan reprimiendo los mRNAs que codifican los Factores de Transcripción de Respuesta a Auxinas ARF2, ARF3 y ARF4. Las auxinas participan tanto en la formación y crecimiento de raíces laterales como en la infección rizobiana y organogénesis del nódulo. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la vía miR390/TAS3 regula positivamente el crecimiento de raíces laterales y negativamente la nodulación en plantas de *Medicago truncatula* (Hobecker et al, 2017). También se evaluaron los cambios a nivel de transcriptoma desencadenados por la activación de la vía miR390/TAS3 mediante la sobreexpresión del miR390 (OX390). A partir de este análisis se identificaron genes que se hallan reprimidos en plantas OX390 frente a raíces *wild type* en condiciones simbióticas (i.e. luego de la inoculación con rizobio). Uno de esos genes identificados es un gen que codifica un miembro de la familia de factores de transcripción LOB (LBD17/29). Con el objetivo de dilucidar la función del gen LBD17/29 en la organogénesis de nódulos y raíces laterales en *M. truncatula* hemos estudiado el patrón de expresión de su promotor utilizando fusiones transcripcionales a genes reporteros observando su expresión en zonas meristemáticas en raíces principales y laterales, también se observó su expresión en nódulos maduros e inmaduros. Por otro lado, evaluamos plantas con niveles reducidos del gen LBD17/29 mediante la expresión de RNA de interferencia (LBD17/29 RNAi) y, plantas que sobreexpresan dicho gen mediante su expresión ectópica y constitutiva (OXLBD17/29). La caracterización fenotípica en las raíces transgénicas reveló una disminución significativa en la formación de nódulos tanto en plantas OXLBD17/29 como en aquellas que silencian el gen LBD17/29. Por otra parte se observó una disminución en la longitud de las raíces principales y laterales en las plantas LBD17/29 RNAi y un aumento de dichos parámetros en las plantas OXLBD17/29. Estos resultados sugieren que el gen LBD 17/29 cumple una función crucial en el desarrollo de órganos laterales en *M. truncatula*.

Mecanismos de tolerancia a la acidez en los rizobios y su relación con la eficiencia en la fijación simbiótica de nitrógeno. Ramiro Rocco Welsh

En el marco de una agricultura sustentable, la Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) realizada por bacterias en asociación simbiótica con leguminosas es un factor importante desde el punto de vista de la agro sustentabilidad y de la productividad agropecuaria, siendo la misma un evento crucial para asegurar la absorción de nitrógeno atmosférico a los suelos agrícolas. La alfalfa es la leguminosa forrajera más cultivada para la alimentación animal. Su crecimiento y, sobre todo, su asociación simbiótica con el rizobio eficiente *Sinorhizobium meliloti*, se ve fuertemente afectada en suelos con pH moderadamente bajos. Hace algunos años, nuestro grupo aisló un tipo de rizobio no caracterizado capaz de nodular alfalfa. Dicho rizobio se caracterizó como *Rhizobium favelukesii*. Debido a sus características particulares fenotípicas, *R. favelukesii*, ha atraído la atención de los rizobiólogos. Este es muy competitivo para la nodulación de alfalfa en suelos ácidos y es ineficiente para FSN en asociación con la alfalfa. Todos estos factores señalan a este grupo de rizobios como un potencial factor de riesgo en los suelos agrícolas en los que coexisten y compiten con *S. meliloti*. En años precedentes hemos caracterizado la respuesta al estrés ácido de *R. favelukesii* LPU83 a través de un enfoque integrador, analizando tanto la respuesta global del transcriptoma (RNA-Seq) como la del proteoma (*shotgun proteomics*) frente a condiciones de estrés ácido. Estos estudios proporcionaron una colección de genes diferencialmente regulados, tanto a nivel transcripcional como traduccional, que serían potenciales blancos de estudios para la respuesta de este rizobio al estrés ácido. A su vez, un análisis minucioso sobre el nivel de correlación de ambas técnicas (transcriptómica y proteómica) evidenció una alta, pero no total coherencia al comparar los valores de expresión de cada uno de los genes diferencialmente detectados. Esta divergencia podría explicarse por mecanismos de regulación mediados por ARN pequeños. Estos tienen un papel fundamental en la regulación de distintos genes mediante su interacción con mRNA, es decir, nivel post-transcripcional. Dada la importancia de la FSN en la sustentabilidad del cultivo de alfalfa, la existencia de suelos ácidos en nuestro país y el desafío que estos proponen al desarrollo de dichos cultivos nos proponemos: por un lado, caracterizar genes asociados a tolerancia a la acidez y su rol para la adaptación en los distintos estilos de vida del rizobio: vida libre y simbiótica. Y, por otro lado, estudiaremos el rol de los pequeños ARNs en los mecanismos de respuesta a acidez. Con todo esto no proponemos avanzar en la obtención de cepas de rizobios tolerantes a la acidez y eficientes en la FSN.

YFV induce estrés del aparato de Golgi y activa a CREB3L1. *Silvia Valeria Aquila*

La Fiebre Amarilla es una enfermedad endemo-epidémica en áreas subtropicales y tropicales de África y América del Sur que es causada por el flavivirus homónimo. Debido al cambio climático se ha estimado una expansión futura del área endémica que se correlaciona con la distribución de los mosquitos que son vectores del YFV, principalmente pertenecientes a los géneros *Haemagogus* y *Aedes*. En relación a la República Argentina, ocurren casos esporádicos y brotes epidémicos, en general asociados a casos/brotes en países vecinos como Brasil, Paraguay y Bolivia, donde la enfermedad es endémica. El YFV es un virus con envoltura lipídica, de simetría icosaédrica y aprox. 50 nm de diámetro cuyo material genético reside en una única cadena de RNA de polaridad positiva y 11 kb. La organización genómica del YFV muestra que posee un único marco de lectura con las proteínas estructurales (C, E y M) en primer lugar, seguidas de 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) que participan en la replicación viral o antagonizan la respuesta antiviral del huésped. Las células responden al estrés con diversos mecanismos que incluyen el estrés de sus organelas. En la respuesta con estrés del aparato de Golgi, la capacidad insuficiente de la organela resulta en un aumento de la expresión de las enzimas asociadas a la glicosilación y a los componentes del transporte vesicular. En los últimos años se han identificado varias vías de la respuesta de las células de mamífero al estrés del Golgi, específicamente las vías TFE3, HSP47 y CREB3. Muy recientemente, fue reportado que los flavivirus DENV y ZIKV inducen estrés del Golgi a través de sus proteínas NS1 en un estudio que utilizó monensina como control positivo. Por lo tanto, en este estudio nos propusimos averiguar si el YFV también produce estrés del Golgi utilizando monensina y brefeldina A como controles positivos y estudiar por IFI la proteína GM130 residente del Golgi. Los resultados indicaron que YFV induce estrés del Golgi en forma similar a la monensina. A su vez, el tratamiento con monensina reduce la replicación viral pero no así el tratamiento con brefeldina A. De las 5 proteínas que están involucradas en la vía CREB3, se estudió la proteína CREB3L1 e interesantemente se observó que esta proteína es activada y traslocada al núcleo por la infección con YFV. En el futuro se estudiará el rol de la proteína NS1 de YFV y las consecuencias de la activación de CREB3L1 en la infección por YFV.

La asociación fijadora de nitrógeno en la diversidad de leguminosas de interés para la alimentación humana: Estudio *in silico* de genes simbióticos en poroto, lenteja y garbanzo.
Dardo Dallachiesa

Las leguminosas representan una alternativa de cultivo amigable para enfrentar el cambio climático y el deterioro de los suelos. El aumento de la población mundial en las próximas décadas exige un aumento en el suministro de alimentos con un daño mínimo al medio ambiente. En particular, el frijol común es una de las leguminosas más populares utilizadas para la alimentación humana directa en regiones occidentales como América Latina y África, mientras que el garbanzo es importante para Asia e India. La formación de nódulos por bacterias rizobios es un proceso complejo de varios pasos que se inicia por señalización mutua entre ambos socios. Los lipochitooligosacáridos producidos por los rizobios son percibidos como factores de nodulación por los receptores de la planta (Nodulation factor receptors NFR), lo que desencadena la activación de varios genes de la respuesta temprana que conduce a la formación de nódulos. Los genes de esta vía de nodulación se han identificado principalmente en las denominadas leguminosas modelo *Medicago truncatula* y *Lotus japonicus*. Aprovechando la disponibilidad de secuencias de genes de simbiosis en bancos públicos y también de los laboratorios asociados, se examinaron genes ortólogos de *nfr* (Nodulation Factor Receptor), *nin* (Nodulation Inception), *ccamk* (kinase Calcium Calmodulin), *cyclops*, *nsp1* en frijol común, lenteja, garbanzo y otras legumbres, y comparadas entre ellas mediante análisis *in silico*. El proyecto INCREASE, del cual somos parte, se centra en frijoles comunes, lentejas, garbanzos y lupinos, mientras que actualmente en nuestro laboratorio se están examinando seis genes de plantas implicados en la simbiosis para determinar su conservación y divergencia. Las secuencias recuperadas de los bancos de genes y proporcionadas por el consorcio se utilizaron para realizar comparaciones y establecer árboles filogenéticos.

La ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) es requerida para la eficiente colonización de la raíz de soja por *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Rocío Balda

Bradyrhizobium diazoefficiens es una bacteria que puede vivir en forma libre en suelo, o simbióticamente dentro de nódulos en las raíces de soja. En vida libre puede utilizar D-manitol (D-Mtl) o L-arabinosa (L-Ara), entre otras fuentes de C y energía. Cuando utiliza D-Mtl expresa las enzimas del ciclo de Calvin-Benson-Bassham (CBB), pero no así cuando utiliza L-Ara. Para entender mejor el rol del CBB en *B. diazoefficiens* construimos una mutante delecional en la subunidad mayor de la RuBisCO (*cbbL*), principal enzima del CBB, en la cepa USDA 110T. Respecto a este tema, nos propusimos comparar la eficiencia en la colonización de la rizósfera de plantas de soja entre la cepa salvaje USDA 110 y la mutante en la RuBisCO, así como la competición de ambas para la nodulación; además investigamos operones CBB en el grupo Rhizobiales.

La mutante ($\Delta cbbL$) mostró un defecto en su crecimiento en medio mínimo con D-Mtl respecto de la cepa salvaje. La mutación no provocó defectos en la nodulación de soja en condiciones libres de N. Sin embargo, cuando las plantas fueron coinoculadas con $\Delta cbbL$ y LP 3004 (derivada de USDA 110, resistente a estreptomycin) en proporción 1:1, sólo el 2,3% de los nódulos contuvieron únicamente a $\Delta cbbL$. En comparación, cuando se coinocularon con USDA 110 y LP 3004, el 22,4% de los nódulos contuvieron solamente a la USDA 110. En ensayos de colonización rizosférica pudimos observar que, luego de una agitación suave o una más vigorosa, hay mayor desprendimiento de USDA 110 que de la mutante, indicando que tiene problemas para colonizar las raíces de soja en comparación con la salvaje. Cuando estudiamos la filogenia de las subunidades de RuBisCO mediante el concatenado de las secuencias aminoacídicas de CbbL, CbbP (fosforibuloquinasa) y CbbR (regulador transcripcional del operón) con diversas ortólogas de las Rhizobiales, exceptuando Bradyrhizobiaceae, observamos que Labrys sp. KNU-23 (familia *Xanthobacteraceae*) agrupa con *B. diazoefficiens*, a diferencia de un concatenado de genes *housekeeping* para las mismas bacterias.

Se ha propuesto que, en bacterias no fotosintéticas, el CBB podría cumplir un rol como sumidero del exceso de poder reductor. En concordancia con ello, en medio mínimo la cepa mutante acumuló más polihidroxicanoatos y exopolisacárido que la cepa salvaje. Dado que ambos polímeros requieren NAD(P)H para su biosíntesis, esto sugiere que hubo un exceso de poder reductor no canalizado hacia el CBB en la cepa mutante.

Nuestros resultados indican que, en *B. diazoefficiens*, el operón *cbb* podría jugar un papel en aliviar la sobrecarga de poder reductor, lo que sería necesario para la eficacia de la nodulación temprana de soja.

Control transcripcional de la preferencia de cepa en la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli*. Rol de GTPasas monoméricas en la simbiosis fijadora de nitrógeno.
Cretton Marina

En nuestro laboratorio se estudia la fijación biológica de nitrógeno derivada de la simbiosis entre leguminosas y rizobios. En una línea de investigación se estudia el control transcripcional de la preferencia de cepa en la simbiosis entre *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium etli*. Se sabe que la especificidad de la interacción está determinada por el reconocimiento entre la planta hospedadora y el rizobio, incluyendo diferentes cepas de una misma especie. El objetivo general de mi trabajo es estudiar los cambios epigenéticos que ocurren en respuesta a cepas de rizobio que producen una mayor eficiencia en la fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. etli*. Para esto, se aislarán núcleos a partir de extractos de tejido de raíz utilizando la técnica INTACT (Isolation of Nuclei TAgged in specific Cell Types). Una vez obtenidos, se estudiará la accesibilidad de la cromatina mediante ATAC (Assay for Transposase-Accessible Chromatin). Se utilizarán las variedades de poroto Mesoamericano y Andino, las cuales serán inoculadas con cepas nodC- α , cepas nodC- δ o YEM como control. Además, se utilizarán tres construcciones distintas (pPEP, pEXP, p35S) las cuales permitirán el aislamiento de núcleos de córtex, epidermis y raíz, respectivamente. En otra de las líneas de investigación se estudia el rol de las GTPasas monoméricas en la simbiosis fijadora de nitrógeno. El proceso de elongación del hilo de infección (IT) requiere una inversión del crecimiento polar del pelo radical. Este proceso se caracteriza por un intenso tráfico de vesículas asociado a eventos de señalización y de remodelación de membrana, donde las GTPasas monoméricas actúan como reguladores de las distintas etapas del proceso. Se plantea que el tráfico de vesículas y los rearrreglos del citoesqueleto, ambos procesos regulados por GTPasas monoméricas, cumplen funciones clave durante las primeras etapas de la interacción simbiótica para dar lugar al proceso de infección. El objetivo es modificar y adaptar la técnica INTACT para purificar vesículas intracelulares asociadas a la proteína ArfA1 y RabA2. RabA2 forma parte de los mecanismos de crecimiento polar del pelo radical, así como en los eventos que ocurren en respuesta al rizobio: cambio del eje de crecimiento y formación del IT. ArfA1 fue identificada por su patrón de co-expresión con RabA2 y está asociada al tráfico de vesículas en células eucariotas. Se realizará una fusión de las proteínas RabA2 o ArfA1 a GFP y a un dominio aceptor de biotina. A partir de extractos de raíces transgénicas se realizará la purificación de vesículas por afinidad y se caracterizarán las proteínas presentes mediante espectrometría de masas. Por otro lado, se continúa el estudio del rol de FIP2 en la nodulación mediante genética reversa. FIP2 fue identificada a partir de su interacción física con ArfA1 en un screening de doble híbrido de levadura. Se ha propuesto que esta proteína funciona como un adaptador para la acción de E3 ubiquitin ligasas y se verificó su interacción con componentes del citoesqueleto.

Vacuna experimental contra *Bordetella pertussis*: evaluación de la vía mucosal de inmunización. Erika Susana Rudi

Pertussis es una enfermedad respiratoria inmunoprevenible que actualmente se considera un grave problema de salud. La situación epidemiológica de la enfermedad indica la necesidad de una tercera generación de vacunas acelulares capaces no sólo de inducir una respuesta inmune de larga duración, sino además reducir la colonización nasal y con ello la transmisión de la enfermedad. Nuestro laboratorio diseñó una nueva vacuna basada en OMVs de *Bordetella pertussis* (OMV) que es segura, altamente inmunogénica y efectiva para prevenir la colonización pulmonar en un modelo de desafío intranasal en ratón. Como parte del objetivo de mi tesis doctoral evaluamos estrategias de inmunización mucosales de modo de analizar la capacidad de las OMVs de proteger también contra la colonización nasal de *B. pertussis*. En particular, evaluamos la vía de inmunización intranasal (IN) y la sublingual (SL) en comparación con la vía intramuscular (IM). Para ello empleamos el modelo murino en 2 cepas de ratón: Balb/C (respuesta inmune dominante Th2/M2) y C57BL/6 (respuesta inmune dominante Th1/M1). Se usaron ratones no inmunizados como control. Después del desafío con dosis subletales de *B. pertussis* Tohama en ambas cepas de ratones, detectamos que la administración IN con OMV induce un nivel significativo de protección contra la colonización nasal ($p < 0,05$ vs grupo sin inmunizar); similares a los observados con la inmunización IM. El esquema SL no evitó la colonización nasal. Para las vías IM e IN luego del desafío con *B. pertussis* se detectaron niveles de IgA tanto en mucosas respiratorias como en suero superiores a los detectados con la vía SL ($p < 0,05$). La estrategia IN en ratones C57BL/6 fue más eficaz en el control de la colonización nasal por pertussis que la inmunización IN en ratones Balb/C (reducción de la carga bacteriana vs control en C57BL/6 vs Balb/C: 1,3 frente a 0,58 Log; $p < 0,05$). La caracterización de la respuesta inmune humoral y celular indicó que todos los esquemas evaluados inducen un perfil Th1-Th17. En base a estos resultados y a la evidencia de que los esquemas de inmunización *prime-boost* de vías heterólogas generan respuestas inmunes más robustas, en una segunda instancia continuamos la caracterización en el modelo murino C57BL/6 y combinamos la vía SL de mayor aceptabilidad con la IM en esquemas IM-SL y SL-IM. Como controles empleamos esquemas homólogos IM-IM, SL-SL y animales sin inmunizar. Luego del desafío con una dosis subletal de *B. pertussis* detectamos que el esquema IM-SL fue superador en la reducción de la colonización nasal (1,07 Log vs del grupo sin inmunizar; $p < 0,0001$), en comparación al esquema SL-IM y al IM-IM (0,7 Log; $p < 0,01$). El esquema IM-SL indujo los niveles más elevados de IgA en suero y en pulmón ($p < 0,05$). Los resultados alcanzados muestran la factibilidad de emplear a las OMVs no sólo por vía sistémica sino también a través de las vías mucosales con intención de reducir la colonización en la cavidad nasal y con ello la transmisión.

Rol de la mitocondria en la infección por el virus Junín. M. Luján Scalise

El virus Junín (JUNV) es el agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina. Es bien sabido que los virus desarrollan estrategias para evadir los mecanismos de defensa celular. En particular, las mitocondrias, además de participar en diversos procesos fisiológicos, poseen un importante rol en los mecanismos de defensa celular. La dinámica mitocondrial incluye la fisión, fusión, desplazamiento y anclado de las mitocondrias. La hipótesis de trabajo es que la alteración de la dinámica mitocondrial por JUNV podría facilitar la evasión viral. Con el objetivo de estudiar el rol de la dinámica mitocondrial en la replicación de JUNV, en primer lugar, se caracterizó la infección de JUNV (cepa P3441, MOI 1) en células A549. Luego se realizó una tinción mitocondrial con Mitotracker a los 1 y 3 días posinfección (dpi), seguido del análisis por citometría de flujo y finalmente se procedió a realizar un estudio morfométrico de la red mitocondrial utilizando microscopía confocal seguido del análisis de la red mitocondrial *in silico* empleando el software Fiji con el plugin MiNA. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de antígeno viral en el citoplasma celular, la infectividad de los sobrenadantes produjo un pico de infección a los 2-3 dpi seguido de un lento descenso, mientras que el conteo celular no mostró diferencias entre las células control y las infectadas. Los resultados con Mitotracker analizados por citometría de flujo indicaron que no hubo diferencias significativas entre el control y las células infectadas, sin embargo, considerando que esta aproximación pudiera no ser lo suficientemente sensible, el estudio morfométrico por microscopía confocal analizado por MiNA demostró que el número de mitocondrias, el área de estas, el número de redes y la cantidad de ramas de estas, fueron modificadas por la infección viral, tanto a 1 como a 3 dpi. A fin de estudiar en mayor profundidad el rol de estas modificaciones en la replicación de JUNV, se realizaron ensayos en presencia o ausencia de las drogas carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP), que induce fisión mitocondrial y de Mdivi-1, que inhibe la fisión mitocondrial. Ambas drogas redujeron significativamente el número de partículas infecciosas a 3 dpi ($p < 0,001$ para CCCP y $p < 0,5$ para Mdivi1, $n=10$). A modo de conclusión, los hallazgos demuestran una alteración en la mitocondria durante la infección viral, por lo tanto, a futuro, se planea estudiar los posibles mecanismos y moléculas implicados.

Integración de enfoques experimentales y bioinformáticos para el estudio de interacciones entre bacterias y plantas: La interacción *Pantoea-Medicago sativa* como modelo de estudio. *Sofía Erdozain Bagolin*

Las plantas se encuentran naturalmente colonizadas por diversos microorganismos que conforman su microbioma. La planta provee nichos endofíticos y exofíticos que los microorganismos habitan, y es el conjunto planta-microorganismos —conocido como el holobionte— el que evoluciona adaptándose a los cambios del ambiente. Los microbiomas vegetales son actualmente foco de numerosos estudios orientados a entender sus mecanismos de colonización y heredabilidad. El proceso de colonización endofítica, en particular, es de especial interés ya que implica compatibilizar los sistemas de defensa de la planta con los microorganismos colonizadores. En nuestro grupo estudiamos el microbioma asociado a alfalfa (*Medicago sativa*), abordando distintos enfoques que nos permitan conocer más sobre las relaciones que se establecen en este complejo sistema, tanto entre la planta y los microorganismos como entre los distintos microorganismos que co-habitan y compiten en el nicho vegetal. Mi tesis doctoral se centra en la búsqueda de determinantes genéticos bacterianos asociados a la colonización rizosférica y endofítica de la planta, usando como sistema modelo la interacción *Pantoea sp.*-alfalfa. Con este fin, utilizamos la metodología de mutagénesis generalizada por transposición para construir una biblioteca de mutantes de nuestra bacteria modelo, *Pantoea sp.* LPU12, definida en estudios previos como endófito de *M. sativa*. Estos mutantes empleando una estrategia TnSeq serán evaluados empleando una estrategia TnSeq, en ensayos de colonización para dilucidar qué genes bacterianos son relevantes en este proceso. Para abordar este estudio, en primera instancia, caracterizamos la cinética de colonización por parte de *Pantoea*. Definimos los tiempos requeridos por la bacteria para colonizar tanto rizósfera como endosfera y densidades poblacionales alcanzadas, y determinamos si la población de *Pantoea* dentro de la planta guarda relación directa con la representación (numérica) de diferentes *Pantoeas* presentes en el inóculo. A su vez, modificamos el vector utilizado para la mutagénesis por transposición, adaptándolo a nuestro sistema bacteriano y construimos la biblioteca de mutantes.

Finalmente, y complementario a los estudios previos, aplicamos un enfoque bioinformático y desarrollamos modelos de clasificación por *Machine Learning* que permitieran inferir, con alto poder predictivo (exactitud >90%), si una bacteria del género *Pantoea* tiene capacidad de asociarse a plantas. Estos modelos permitieron encontrar características funcionales en los genomas de este género (COGs, Pfams) que son importantes para la asociación de *Pantoea* con plantas.

Los análisis experimentales y bioinformáticos realizados permitieron caracterizar nuestro modelo de estudio, construir una biblioteca de mutantes en *Pantoea sp.* LPU12, generar modelos de clasificación con alta capacidad para predecir tropismo a plantas y tener un primer acercamiento a las características genéticas potencialmente involucradas en la colonización de plantas por *Pantoea*.

Metilación del RNA y su función en el control de la traducibilidad de mRNAs durante la simbiosis fijadora de nitrógeno. *Marianela Cueva Morales*

El control post-transcripcional del procesamiento, transporte, traducción y decaimiento de RNA es un proceso crítico para asegurar la regulación espacio temporal de la expresión génica y ejecutar coordinadamente los procesos de desarrollo y respuesta a estímulos en organismos eucariontes. Estos mecanismos de control proveen versatilidad permitiendo a las células responder rápidamente frente a estímulos a través del control traduccional de RNAs. Las modificaciones dinámicas del RNA, conocidas como marcas epitranscriptómicas, han emergido como un nuevo mecanismo de control post-transcripcional de la expresión génica. La metilación de N6-adenosinas del RNA (m6A) es la modificación covalente más abundante en los RNAs de organismos eucariontes e influencia diferentes aspectos asociados al metabolismo del RNA, desde su procesamiento en el núcleo hasta su traducción y decaimiento en el citoplasma. El advenimiento de los métodos de secuenciación masiva e identificación de bases nitrogenadas modificadas permitió acceder al epitranscriptoma en diversos sistemas biológicos, revelando una amplia heterogeneidad en las moléculas de RNAs modificadas y la reversibilidad de dichas modificaciones. Desde el punto de vista biotecnológico, la modulación de la m6A del RNA demostró tener un efecto positivo sobre la producción de biomasa, la tolerancia a la sequía y el rendimiento de los cultivos de papa y de arroz, sugiriendo que la metilación del RNA constituye una herramienta biotecnológica prometedora para incrementar el rendimiento de los cultivos y la producción de semillas. En un estudio reciente de nuestro grupo de trabajo analizamos los cambios a nivel traduccional que ocurren en células de la raíz de la leguminosa *Medicago truncatula* durante su asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno. Esta interacción simbiótica resulta en la formación de un órgano especializado en la fijación de nitrógeno, denominado nódulo, que depende de la activación coordinada de dos programas genéticos en las células de la raíz. Entre los mRNAs regulados a nivel traduccional se identificaron transcriptos que codifican proteínas involucradas en la modificación del estado de compactación de la cromatina, la regulación transcripcional y el decaimiento del RNA, indicando que la traducción contribuye a ajustar dinámicamente la expresión de genes que participan en otros niveles de regulación durante la simbiosis. Teniendo en cuenta que la m6A de RNA es esencial para la división y diferenciación celular, y que estos procesos celulares operan durante la simbiosis, el objetivo general del presente proyecto es dilucidar la influencia y función de la m6A sobre traducibilidad de mRNAs durante el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Vacunación heteróloga como estrategia preventiva superadora contra pertussis, una enfermedad respiratoria resurgente. *Lucía Locati*

En respuesta a la resurgencia de la enfermedad respiratoria pertussis, nuestro grupo de investigación ha diseñado una nueva formulación acelular-multi-antígeno que consiste en vesículas de membrana externa (OMV) derivadas del agente causal *Bordetella pertussis*. En los ensayos preclínicos este candidato vacunal ha superado las deficiencias que presentan las vacunas acelulares en uso. Uno de los desafíos para las nuevas vacunas es el de generar inmunidad protectora frente a aislamientos de *B. pertussis* deficientes en la expresión del inmunógeno vacunal pertactina que resultan ser más resistentes a la inmunidad conferida por las vacunas. Los antecedentes sobre la mayor inmunogenicidad de esquemas prime-boost heterólogos nos llevaron a plantear el empleo de esta estrategia para hacer frente a los aislamientos resistentes actualmente circulantes. Empleamos para ello el modelo murino de desafío intranasal sobre el que ensayamos los esquemas heterólogos que, para preservar su confidencialidad, nombraremos como: Vac1-Vac2, Vac2-Vac1, Vac2-aP y aP-Vac2. Como controles empleamos animales tratados con esquemas homólogos y sin inmunizar. En todos los grupos ensayados evaluamos los niveles de IgG total e isotipos específicos para *B. pertussis*. Evaluamos también la avidéz y la capacidad bactericida de los sueros inmunes. Los resultados alcanzados mostraron que los esquemas que incluyen la vacuna Vac2 presentan títulos de IgG total e isotipos más elevados que aquellos tratamientos donde la misma no se encuentra incluida ($p < 0.05$). El esquema heterólogo Vac1-Vac2 indujo los mayores niveles de anticuerpos con mayor capacidad bactericida que el resto de los tratamientos frente a un control sin inmunizar ($p < 0,05$). Los esquemas que comienzan con una dosis de aP inducen anticuerpos de menor afinidad. Respecto a la respuesta celular inducida, los esquemas que incluyeron a las OMVs indujeron un perfil mixto Th1, Th17 y Th2. Para evaluar capacidad protectora trabajamos con una técnica puesta a punto en el laboratorio que considera el número de unidades formadoras de colonias por recuento en placa. Observamos que todos los tratamientos ensayados otorgan protección en el corto plazo de manera indistinta.

Los resultados alcanzados hasta ahora muestran que los esquemas heterólogos que incluyen a la formulación Vac2 son más inmunogénicos y presentan mayor potencialidad para prevenir la colonización bacteriana.

Caracterización de un aislamiento local de *Mannheimia haemolytica*. Agustín Franchi

Mannheimia haemolytica es una bacteria Gram negativa que se aísla con frecuencia de los feedlots argentinos. Es un habitante frecuente de las vías respiratorias superiores (orofaringe), donde forma poblaciones estructuradas (biofilm). Debido a factores externos inductores de estrés, como el transporte, cambios de alimentación, cambios climáticos o coinfecciones, estas poblaciones se desarman y pasan a las vías respiratorias inferiores produciendo enfermedad respiratoria bovina (ERB). Esta enfermedad provoca pérdida de peso y muerte en los terneros por lo que es de gran importancia económica para la industria ganadera. Nuestro laboratorio, en colaboración con la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP, ha obtenido un aislamiento a partir de un animal con síntomas de ERB. Durante mi trabajo de tesis he iniciado la caracterización de este aislamiento. La caracterización inicial de laboratorio incluye curvas de crecimiento, formación de biofilm sobre superficies de plástico y de vidrio y formación de macrocolonias sobre medios semisólidos. Estudiamos la formación de biofilm en superficies de vidrio y observamos que hay una mejor formación que en superficies plásticas. Pudimos observar que la formación del biofilm fue aún mayor al realizar el ensayo en agitación. Algunos autores describieron una fuerte correlación entre la formación de biofilm y la hormona liberada en el estrés, la adrenalina, como un posible agente inductor del desarmado del biofilm. Probamos este efecto realizando un tratamiento post formación tanto en tubos como en cubreobjetos de vidrio. En el caso de los cubre objetos se realizó el ensayo con una *M. haemolytica* construida en este trabajo que expresa GFP para observar la estructura del biofilm mediante microscopía confocal. Como parte de la caracterización se realizó el secuenciamiento de esta cepa local, el análisis genómico y filogenético, confirmando que el aislamiento encontrado es una *M. haemolytica* de características únicas de la argentina. En el genoma buscamos posibles factores de virulencia, entre ellos la toxina LktA que es un factor de virulencia ya descrito, y evidenciamos su presencia en el sobrenadante de cultivo.

Con el fin de poder evaluar en un futuro el rol de los factores de virulencia encontrados, evaluamos posibles modelos de infección. El modelo de infección del nematodo *Caenorhabditis elegans* nos resultó adecuado. Pudimos observar que *M. haemolytica* presentó una mayor tasa de muerte que la bacteria control. Considerando que la formación de biofilm es importante para el proceso de infección, iniciamos la búsqueda de proteínas involucradas en este proceso. Para ello, comparamos el proteoma de bacterias formando biofilm, en forma de macrocolonia, con respecto a las presentes en bacterias en crecimiento plantónico. Esperamos que estos resultados (análisis genómico y proteómico) nos permitan conocer qué factores de virulencia están involucrados en el desarrollo de la ERB.

La localización en cloroplastos de la proteína de movimiento del virus de la psorosis de los cítricos es esencial para ejercer su función de movimiento viral. Ana Marchesini

Las infecciones por virus de plantas son responsables de enormes pérdidas de cultivos y dada su adaptabilidad ante estrategias de defensas su erradicación parece imposible. Comprender los ciclos de infección viral resulta esencial para diseñar estrategias de protección y asegurar la productividad y calidad de los productos vegetales. El virus de la psorosis de los cítricos (CPsV), miembro tipo de los *Ophiovirus*, es el agente causal de la psorosis de los cítricos, una enfermedad distribuida en todo el mundo que afecta todas las especies cítricas y genera la muerte del 5% de las plantas productoras por año. La infección temprana de CPsV causa manchas cloróticas en hojas jóvenes y progresa con la acumulación de goma en el sistema vascular, causando eventualmente la muerte de la planta. No hay reportes de resistencia natural ante este virus. CPsV es un virus a RNA negativo, tripartito. En su RNA2 codifica para una proteína de 54 kDa (54K) que actúa como proteína de movimiento del virus. 54K localiza en núcleo, citoplasma, cloroplastos (Chl) y plasmodesmos (PD), y altera la estructura de los PD, incrementando su límite de exclusión por tamaño (SEL) y formando túbulos que facilitan el movimiento célula-a-célula del virus. Los Chl juegan un rol central en una de las vías de defensa de la planta ante ataques por patógenos, sintetizando hormonas de señalización, especies reactivas de oxígeno, y regulando a través de señales la apertura o cierre de PD, convirtiéndose en una organela blanco en las infecciones virales. La mayoría de los virus de plantas causan clorosis en sus hojas durante las infecciones, esto es producido por alteraciones en los Chl y la consecuente afección de la tasa fotosintética. Observaciones en el microscopio electrónico de transmisión de hospedantes herbáceos infectados con CPsV muestran modificaciones tanto en la estructura y tamaño de los Chl como también en su distribución, comparado con plantas no infectadas. Estos resultados, junto con la localización en Chl de la 54K, sugieren que esta proteína se dirige a la organela como parte del ciclo infectivo de CPsV. Mediante análisis *in silico* de la 54K identificamos un péptido de tránsito a Chl (cTP) conservado en otros *ophiovirus*. Para testear la hipótesis planteada diseñamos mutantes de 54K en su cTP, eliminando este péptido, bloqueándolo y reemplazándolo por el cTP de una proteína cuya localización en Chl esté reportada, como la subunidad menor de la RUBISCO (RbcS). Estos mutantes fueron utilizados para evaluar el rol de la localización en Chl en la distribución subcelular de 54K, la regulación del SEL y el movimiento viral célula-a-célula. Nuestros resultados muestran que la presencia del cTP nativo de 54K es fundamental para su localización dual en Chl y PD y su funcionamiento como proteína de movimiento. Futuros resultados nos permitirán describir el rol específico de la localización de 54K en las respuestas inmunes mediadas por Chl.

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular -IBBM

Jornadas de Seminarios del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular-IBBM 2022 : libro de resúmenes /
compilación de Carla Martini ... [et al.] ; editado por Carla Martini ; M. Leticia Ferrelli. - 1a ed. - La Plata :
Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, 2023.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-950-34-2258-8

1. Microbiología. 2. Virología. 3. Biotecnología. I. Martini, Carla, comp. II. Ferrelli, M. Leticia, ed. III. Título.
CDD 636.08944

