



**PPGMAA**  
Programa de Pós Graduação de  
Microbiologia Aplicada – UFRGS  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde  
Rua Sarmento Leite, 500 Sala: 052  
Porto Alegre - RS - Brasil  
CEP: 91050-170  
Fone: (0xx51)3308.3788

e-mail: [simpesiomicro@gmail.com](mailto:simpesiomicro@gmail.com)

**ANAIS**

**VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE  
MICROBIOLOGIA APLICADA  
&  
II ENCONTRO  
LATINO-AMERICANO DE  
MICROBIOLOGIA APLICADA**

**Porto Alegre, 5 a 8 Novembro, 2012**

**ISSN 2237-1672**

## SUMÁRIO BIOTECNOLOGIA/IMUNOLOGIA

### Sumário

[108] - ANÁLISE DO EFEITO DE POLIMORFISMOS NO GENE DA APOBEC3H DE FELINOS SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR RETROVÍRUS.....	4
[109] - AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MARCADOS COM PEROXIDASE PARA DESENVOLVIMENTO DE TESTE DE DETECÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> E <i>Listeria spp.</i> EM ALIMENTOS.....	9
[110] - CLONAGEM DE CONSTRUTO DE RNA INTERFERENTE PARA PRODUÇÃO DE MARUBA-KAIDO RESISTENTE A VÍRUS DE MACIEIRA.....	14
[111] - CLONAGEM DO GENE <i>cgt</i> DE <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> E OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO EM <i>Escherichia coli</i> BL21DE3.....	20
[112] - CLONING AND EXPRESSION OF A CHIMERA WITH ANTIGENS FROM <i>Mycobacterium bovis</i> .....	25
[113] - CONSTRUÇÃO DE VETORES ADENOVIRAIS RECOMBINANTES EXPRESSANDO VARIANTES DA PROTEÍNA VP3 DO GIROVÍRUS AVIÁRIO 2.....	29
[114] - EMA-2 RECOMBINANTE DE <i>Theileria equi</i> EXPRESSA EM <i>Pichia pastoris</i> E SUA UTILIZAÇÃO EM IMUNODIAGNÓSTICOS.....	33
[115] - EXPRESSÃO DA LECTINA TRUNCADA DE <i>Bauhinia forficata</i> EM <i>Escherichia coli</i> .....	38
[116] - EXPRESSÃO HETERÓLOGA E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA lic20087 DE <i>Leptospira</i> .....	43
[117] - FLAGELINAS DE <i>Leptospira interrogans</i> : PRODUÇÃO DE SUBUNIDADES RECOMBINANTES PARA UTILIZAÇÃO COMO ADJUVANTES VACINAIS.....	48
[118] - IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS UTILIZANDO VACINA DE SUBUNIDADE RECOMBINANTE PARA O CONTROLE DA LINFADENITE CASEOSA.....	53
[119] - SELEÇÃO DE CLONES DE <i>E.coli</i> PARA A EXPRESSÃO DE gp19 RECOMBINANTE DE <i>Ehrlichia canis</i> .....	58
[120] - SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Salmonella spp.</i> E <i>Listeria monocytogenes</i> .....	62
[121] - SUPEREXPRESSÃO DO ANTÍGENO 85B DE <i>Mycobacterium bovis</i> EM BCG Pasteur $\Delta$ leuD E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE IN VIVO DO VETOR RECOMBINANTE.....	67
[122] - USO DE IMUNOENSAIOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE UMA SOROTECA CANINA E SUA APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE TESTES DIAGNÓSTICO PARA LEPTOSPIROSE ANIMAL.....	72
[123] - UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MULTIPLEX PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Salmonella spp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> E <i>Campylobacter spp.</i> EM AMOSTRAS DE SUABES DE ARRASTO DE CAMA AVIÁRIA.....	77
[124] - UTILIZAÇÃO DE <i>Leptospira interrogans</i> SOROVAR COPENHAGENI PARA AVALIAÇÃO DE RESPOSTA IMUNE HUMORAL EM MODELO ANIMAL SUSCEPTÍVEL À LEPTOSPIROSE.....	82
[125] - VACINA RECOMBINANTE CONTRA LEPTOSPIROSE: EFEITO PROTETOR DE PREPARAÇÕES UTILIZANDO ADJUVANTE POLISSACARÍDICO.....	87
[126] - VACINAÇÃO DE PORCAS COM TOXÓIDE RECOMBINANTE BIVALENTE DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> .....	91

## [110] - CLONAGEM DE CONSTRUTO DE RNA INTERFERENTE PARA PRODUÇÃO DE MARUBA-KAIDO RESISTENTE A VÍRUS DE MACIEIRA

JUNKES, Camila Fernanda de Oliveira<sup>1</sup>; NICKEL, Osmar<sup>2</sup>; ECKERT, Camila<sup>1</sup>; FAJARDO, Thor Vinícius Martins<sup>2</sup>; VANNI, Marcos<sup>2</sup>; ARAGÃO, Francisco José Lima<sup>3</sup>; DANTAS, Adriana Cibele de Mesquita<sup>1</sup>; PETERS, José Antônio<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, [camila.nanda.junkes@gmail.com](mailto:camila.nanda.junkes@gmail.com)

<sup>2</sup> EMBRAPA Uva e Vinho, [nickel@cnpuv.embrapa.br](mailto:nickel@cnpuv.embrapa.br)

<sup>3</sup> EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas,

### INTRODUÇÃO

A produção de maçãs no Brasil, atualmente considerado o 9º maior produtor mundial da fruta, com 1,275 toneladas em 2010<sup>[3]</sup>, ainda é fortemente ameaçada por fatores socioeconômicos, difícil adaptação das plantas em algumas regiões, doenças fúngicas e virais, e problemas relacionados principalmente à temperatura, altitude e precipitação. Os pomares brasileiros estão altamente infectados por vírus, cuja disseminação pode levar ao declínio e morte da planta, diminuindo a produção e a qualidade dos frutos<sup>[12,13]</sup>. O *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus* (ACLSV) afeta macieiras, pereiras e espécies de rosáceas, produz declínio da planta através de manchas cloróticas, clorose de nervuras, necrose e distorção foliar, necrose do floema e caneluras no xilema em cultivares suscetíveis<sup>[4]</sup>. *Apple Stem Grooving Cappelovirus* (ASGV) infecta a maioria das variedades comerciais de maçã, causando um cancro que destrói a casca do tecido sensível, ocasionando morte ou declínio gradual da planta ainda jovem de cultivares suscetíveis, como o porta-enxerto Maruba-kaido<sup>[11,15,18,19]</sup>. O *Apple Stem Pitting Virus* (ASPV) é um vírus latente que afeta variedades comerciais de maçã, geralmente ocorre em combinação com ACLSV, e cujos sintomas podem incluir a vascularização do xilema, epinastia e declínio da planta, afetando seu crescimento e a produção<sup>[8]</sup>. O *Apple Mosaic Ilarvirus* (ApMV) causa manchas irregulares de cor amarelo a bege nas folhas, desenvolvimento de flores anormais, atrofiadas e queda de frutos jovens<sup>[16,17]</sup>. Muitos desses patógenos são transmitidos por porta-enxertos, que, quando infectados, podem causar grandes perdas na produção e propiciar a contaminação por patologias secundárias<sup>[6]</sup>. O porta-enxerto anão M9, tolerante aos principais vírus, é amplamente difundido no sul do país, embora seja de difícil propagação devido ao fraco sistema radicular, e não possuir ancoramento adequado ao solo. Em contrapartida, Maruba-kaido (*Malus prunifolia*) possui enraizamento robusto, fácil propagação e crescimento vigoroso, embora seja altamente sensível aos vírus ASGV e ACLSV, causando sérios



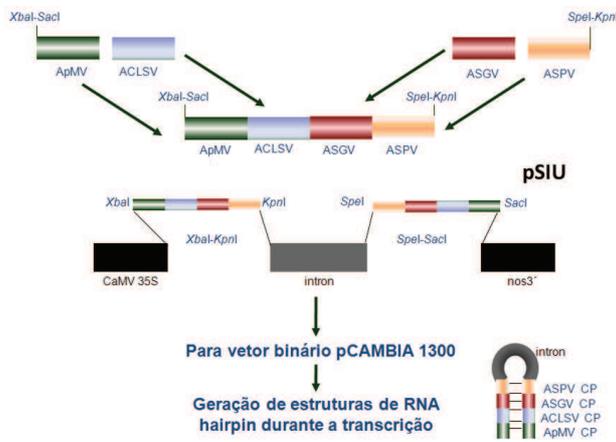


Figura 3. Estratégia de silenciamento mediada por RNA-interferente.

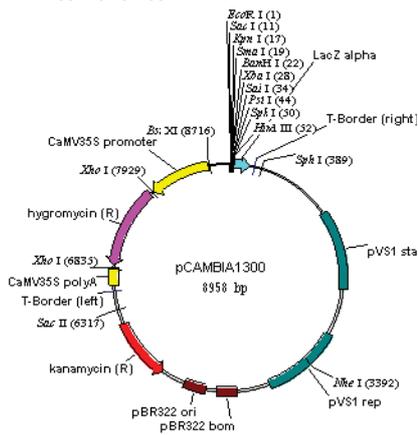


Figura 4. Vetor de binário pCAMBIA 1300, utilizado para transformação com *Agrobacterium tumefaciens*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células de *A. tumefaciens* apresentaram crescimento significativo, atestando que a transformação com o vetor pCAMBIA por meio de choque térmico ocorreu com sucesso. O produto da digestão do vetor apresentou duas bandas, correspondentes ao fragmento inserido e ao vetor sem inserção, segundo comparação com amostras não tratadas (Fig. 5).



Figura 5. Gel de agarose 0,9%, TBE, 90V, 2h.

- M - Marcador  $\lambda$ DNA/*Pst*I
- 1 - pCAMBIA/*Eco*RI e *Hind*III
- 2 - Cassete S+AS
- 3 - pCAMBIA S+AS cl 1/*Eco*RI e *Hind*III
- 4 - pCAMBIA S+AS cl 2/*Eco*RI e *Hind*III

## CONCLUSÕES

As células transformadas possuem o inserto desejado, de forma que poderão ser utilizadas na transformação de explantes de Maruba-kaido que estão sendo cultivadas *in vitro* paralelamente.

## AGRADECIMENTOS

À FAPERGS, pelo financiamento do projeto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]ARAGÃO, J.F.L.; FARIA, J.C. Avanços no desenvolvimento de plantas transgênicas com resistência a doenças no Brasil. RAPP, v.15, 45-68, 2007.

- [2]ARAGÃO, J.F.L. Plantas biotecnológicas para o controle de doenças: primeira década do século XXI. RAPP, v.19, 65-80, 2011.
- [3]FAOSTAT (2004). Statistical Databases, FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em 14 de setembro de 2012.
- [4]GERMAN, S. T.; CANDRESSE, M. LANNEAU; J.C. PERNOLLET & J. DUNEZ. Virology 179, 104-112. 1990.
- [5]GOLDBACH, R.; BUCHER, E.; PRINS, M. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. Virus Research, 92, 207-212, 2003.
- [6]GUERRA, D. S.; NICKEL, O.; VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; MARODIN, G. A. B.; FAJARDO, T. V. M. *Apple stem grooving virus* afeta infecções de manchas foliares causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* em macieiras cv. Maxi Gala. Fitopatologia Brasileira, Brasília, DF, v. 32, p. S 318, ago. 2007.
- [7]HÖFGEN, R.; WILLMITZER, L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. Nucleic Acids Research, v.16, n.20, 9877.
- [8]JELKMANN, W.; KEIM-KONRAD, R. An immunocapture polymerase chain reaction and plate trapped ELISA for the detection of apple stem pitting virus. J. Phytopathol. 145, 499-504, 1997.
- [9]LIU, Q.; INGERSOLL, J.; OWENS, L.; SALIH, S.; MENG, R.; HAMMERSCHLAG, F. Plant Cell Rep, v.20, p.306-3012, 2001.
- [10]LIU, Q.; PAROO, Z. Biochemical principles of small RNA pathways. Annual Review of Biochemistry, v.79, p.295-319, 2010.
- [11]MAGOME, H., YOSHIKAWA, N., TAKAHASHI, T., ITO, T. & MIYAKAWA, T. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. Phytopathology 87:389-396. 1997.
- [12]NICKEL, O., JELKMANN, W. & KUHN, G. Occurrence of Apple stem grooving capillovirus in Santa Catarina, Brazil, detected by RT-PCR. Fitopatologia Brasileira 24:444-446. 1999.
- [13]NICKEL O., FAJARDO T.V.M., JELKMANN W., KUHN G.B. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of Apple stem grooving virus, and its survey in Southern Brazil. Fitopatologia Brasileira 26: 655-659, 2001.
- [14]PARROTT, W.; CHASSY, B.; LIGON, J.; MEYER, L.; PETRICK, J.; ZHOU, J.; HERMAN, R.; DELANEY, B.; LEVINE, M. Food Chemistry and Toxicology, v.48, n.7, p.1773-1790, 2010.
- [15]RODONI, B.C.; CONSTABLE, F.E. The incidence and strain variation of Apple stem grooving and Apple stem pitting viruses in Australian pome fruit. Acta Horticultrae 781:167-174, 2008.
- [16]SÁNCHEZ-NAVARRO, J.A. & PALLÁS, V. Evolutionary relationships in the ilarviruses: nucleotide sequence of prunus necrotic ringspot virus RNA 3. Arch Virol 142, 749-763, 1997.

- [17]SANCHEZ-NAVARRO, J.A.; APARÍCIO, F.; HERRANZ, M.C.; MINAFRA, A.; MYRTA, A.; PALLAS, V. Simultaneous detection and identification of eight stone fruit viroses by one-step RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 111, 77-84, 2005.
- [18]YOSHIKAWA N., IMAIZUMI M., TAKAHASHI T., INOUE N. Striking similarities between the nucleotide-sequence and genome organization of citrus tatter leaf and apple stem grooving capiloviruses. *Journal of General Virology* 74: 2743-2747, 2001.
- [19]YOSHIKAWA N., MATSUDA H., ODA Y., ISOGAI M., TAKAHASHI T., ITO T., YOSHIDA K. Genome heterogeneity of Apple stem pitting virus in apple trees. *Acta Horticulturae* 550: 167- 174, 2001.