RELATÓRIO ANUAL DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA

CIBio-UFV – ANO 2013

1. Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - CNPJ: 25.944.455/0001-96

2. CQB nº: 0024/97

3. Período a que se refere: 14 de janeiro de 2013 a 10 de janeiro de 2014

4. Informar sobre as alterações ocorridas na composição da CIBio:

A nova composição da CIBio estabelecida pelo Ato 0333/2014/RTR de 30 de outubro de 2014 e aprovada pela CTNBio Parecer 4469/2015 de 08 de maio de 2015 ficou assim instaurada:

Prof. Abelardo Silva Júnior (Presidente); Prof. Leandro Licursi de Oliveira; Prof. Denise Mara Soares Bazzolli; Prof. Francisco Murilo Zerbini Júnior; Prof. Juliana Lopes Rangel Fietto; Prof. Wagner Campos Otoni. Como membros suplentes: Prof. Adriano Nunes Nesi; Prof. Gustavo Costa Bressan; Prof. Wendel Batista da Silveira.

5. Relacionar as unidades operativas e instalações utilizadas, especificando os níveis de biossegurança, técnico principal, os projetos de pesquisa ou atividades concluídos ou em andamento, constando os objetivos, a relação dos OGM e derivados que foram objeto das atividades (mencionar o nome comum, nome científico das espécies, genes introduzidos, sua origem e funções específicas), incluindo resumo dos resultados mais relevantes obtidos e referenciar, quando houver, publicações e pedidos de patentes.

Unidades operativas que estão sob a cobertura do CQB 024/97:

- Instalações do BIOAGRO-UFV. Comunicado CTNBio nº 19, Processo n.º 01200.002610/97-04.
- Instalações do Departamento de Engenharia Florestal – UFV. Comunicado CTNBio nº 67, Processo n.º 01200.002610/97-04.
- Instalações da Fazenda Experimental de Coimbra. Comunicado CTNBio nº 85, Processo nº 01200.002610/97-04.

- Casa de Vegetação OGM e Casa de Vegetação localizado no Viveiro de Pesquisas Florestais - DEF/UFV; Laboratório de Cultura de Tecido II e Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente localizado no BIOAGRO; e Laboratório de Solos Florestais localizado no Departamento de Solos/UFV. Parecer CTNBio 0847/2006.
- Casa de Vegetação na unidade que faz parte do BIOAGRO. Parecer CTNBio 3519/2012.

Nestas unidades são desenvolvidos os seguintes projetos:

5.1. Projetos concluídos em 2013:

5.1.1. Silenciamento de genes de patogenicidade do fitopatógeno do feijoeiro *Colletotrichum lindemuthianum* utilizando RNA de interferência

Neste trabalho, nós pretendemos demonstramos, pela primeira vez, a ocorrência do mecanismo de silenciamento por RNA de inferfência em *C. lindemuthianum*, por meio da transformação genética deste fungo com o vetor pSilentDual1-*egfp*, o qual é responsável pela produção de um dsRNA do gene-alvo, determinada pela transcrição a partir de dois promotores fortes e constitutivos de *Aspergillus nidulans* (P*trpC* e P*gpd*) orientados de forma oposta. Além disso, demonstraremos também a potencial aplicação desse mecanismo como uma ferramenta molecular para a caracterização funcional de genes expressos na interação do patógeno com seu hospedeiro. Para isso construíremos o vetor denominando pSilentDual1-*sln*Cl, o qual será capaz de silenciar um gene que codifica uma histidina quinase (*sln*Cl) pertencente à um sistema de dois componentes presente em fungos e mostrar o envolvimento deste gene na resposta adaptativa ao estresse osmótico.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Para obtenção de uma linhagem de *C. lindemuthianum* expressando a proteína EGFP foi utilizado o vetor pSM1 (Poggeler et al., 2003), o qual contém o gene hph de E. coli que confere resistência ao aminoglicosídeo higromicina B. Para silenciamento do gene egfp foi utilizado o vetor pSilentDual1-egfp (pSD1G) (Nguyen et al, 2008), adquirido do FGSC - Fungal Genetics Stock Center (Kansas City, Missouri USA), o qual contém o gene nptII de E. coli que confere resistência ao aminoglicosídeo geneticina (G-418). Para silenciamento do gene slnCl, o qual codifica uma histiquina quinase em *C. lindemuthianum* (GenBank: GU907087.1), foi construído o vetor pSilentDual1-slnCl (pSD1-slnCl). Para construção desse vetor, um fragmento de 450 pb do gene slnCl e

clonado no sítio HindIII do vetor pSilentDual1 (pSD1), também adquirido do FGSC. Ambos os vetores de silenciamento contêm o gene-alvo flanqueado por dois promotores para a RNA polimerase II de *Aspergillus nidulans*, o PtrpC e o Pgpd, levando à produção de um dsRNA que desencadeia a degradação do mRNA-alvo.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos (BIOAGRO).

Medidas de biossegurança adotadas: As linhagens geneticamente modificadas serão manipuladas no laboratório de Genética Molecular de Microrganismos (BIOAGRO), que possui todos os aparelhos e materiais necessários para o crescimento e manipulação controlada destes microrganismos, como câmaras de fluxo laminar e de exaustão, câmara de crescimento. O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* será manipulado em fluxo laminar e o material usado será esterilizado. As culturas serão mantidas em placas de Petri ou frascos de vidro vedados. Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Equipe envolvida: Marisa Vieira de Queiroz (Líder); Elza Fernandes de Araújo; Denise Mara Soares Bazzolli; Sérgio Hermínio Brommonschenkel; Guilherme Bicalho Nogueira; Tales da Silva Mendes.

Artigo: Nogueira GB, Queiroz MV, Ribeiro RA, Araújo EF. Structural and functional characterization of the *Colletotrichum lindemuthianum* nit1 gene, which encodes a nitrate eductase enzyme. Genet Mol Res. 2013; 12(1):420-33. doi: 10.4238/2013.

5.1.2. ENVOLVIMENTO DA TRANSLATIONALLY-CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP) DURANTE AS ETAPAS INICIAIS DA INFECÇÃO DE TOMATEIRO POR POTYVIRUS

O objetivo deste trabalho é estudar o envolvimento do gene que codifica a TCTP no contexto da interação tomateiro-*Potyvirus*. Para isso, serão realizados estudos da cinética e especificidade da indução de TCTP em plantas infectadas e análise funcional do gene em estudo utilizando *Virus induced gene silencing* (VIGS). Para a caracterização de fatores viaris e do hospedeiro que interagem com TCTP será utilizado o método TAP (tandem affinity purification), para isso, serão produzidas

plantas transgênicas de tomateiro expressando a proteína TCTP etiquetada. Para estudar a localização celular de TCTP em plantas infectadas e determinação da proteína viral responsável pela indução de TCTP serão produzidos anti-soros para as diferentes proteínas virais e para TCTP. A capacidade das plantas em montar uma resposta de defesa eficiente depende da capacidade do hospedeiro em reconhecer o patógeno e iniciar um mecanismo de defesa que limite a infecção. Portanto, o conhecimento básico dos mecanismos genéticos, bioquímicos e moleculares que estão envolvidos na interação vírus hospedeiro torna-se extremamente relevante, pois pode permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Receptor: *E. coli* (estirpes JM109, BL21::DE3, BMH 71-18 mutS). Parental: *Solanum lycopersicum*. Gene que codifica a TCTP de *Solanum lycopersicum*

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Microbiologia Industrial (Bioagro).

Medidas de biossegurança adotadas: 1. Acesso ao laboratório restrito ao pessoal credenciado junto ao Bioagro, controlado pelo pesquisador principal. 2. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. 3. Todo material contendo OGM é esterilizado antes do descarte por autoclavagem.

Equipe envolvida:

Poliane Alfenas Zerbini (Líder); Ivan de Godoy Maia; Francisco Murilo Zerbini; Fernanda Prieto Bruckner.

Órgão financiador: CNPq

5.1.3. NTPDase-1 de *Trypanosoma cruzi*: caracterização enzimática, imunolocalização e estudo de seu papel na infecção "in vitro"

Neste projeto, propõe-se através da expressão heteróloga da NTPDase-1 de *T. cruzi* e uso de antisoro policlonal purificado anti- NTPDase-1 de *T. cruzi*, avaliar o papel biológico da NTPDase-1 nos momentos iniciais da infecção em células de mamífero. Além de verificar a imunolocalização da NTPDase-1 nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* por meio de microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Receptor: E. coli (estirpes BL21::DE3). Parental: *T. cruzi.* O material genético incluído no OGM (*Escherichia coli* BL21) refere-se a sequência de nucleotídeos que codifica o ecto-domínio da enzima NTPDase-1 do parasito *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), ligado ao vetor de expressão pET-21b Novagem®. A referida proteína recombinante não é tóxica e não promove geração de patogênese na *E. coli* recombinante. O objetivo é obter a proteína purificada par obtenção de anti-soro.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Infectologia Molecular Animal –BIOAGRO.

Medidas de biossegurança adotadas: Registro de todo material geneticamente modificado desenvolvido; acesso restrito às áreas de manipulação de OGMs; sinalização indicando a experimentação com OGM; autoclavagem de todo material e micro-organismos OGM antes do descarte apropriado.

Equipe envolvida:

Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Márcia Rogéria de Almeida; Gustavo Costa Bressan.

Órgão financiador: CNPq e FAPEMIG

Artigo: Mariotini-Moura C, Bastos MS, de Castro FF, Trindade ML, de Souza Vasconcellos R, Neves-do-Valle MA, Moreira BP, de Freitas Santos R, de Oliveira CM, Cunha LC, Souto XM, Bressan GC, Silva-Júnior A, Baqui MM, Bahia MT, de Almeida MR, Meyer-Fernandes JR, Fietto JL. Trypanosoma cruzi nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. Acta Trop. 2013; 130C:140-147. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.11.008.

5.1.4. Transformação genética de espécies de maracujazeiro (Passiflora sp.)

O objetivo do presente projeto de pesquisa será otimizar o protocolo de transformação genética de maracujazeiro, bem ainda engenheirar a rota biossintética de carotenóides, por meio de transformação genética de tecidos juvenis de maracujazeiro, visando manipular o seu conteúdo de provitamina A, a coloração do fruto. A partir de seqüências de cDNAs dos genes da sintase do fitoeno, desaturase do fitoeno, desaturase do zeta-caroteno e ciclase β do licopeno de C. paradisi, estas

foram introduzidas em vetores de transformação de plantas da série pCAMBIA (Cambia, Austrália), sob o controle dos promotores constitutivos CaMV 35S e FMV 34S, estando disponíveis para estudos envolvendo a manipulação genética da rota biossintética de carotenóides.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Serão utilizadas estirpes de *A. tumefaciens* LBA 4404, EHA 101, EHA 105, contendo genes de reectocelulolíticas. Utilizar-se-à a regeneração via embriogênese somática ou sistência à canamicina ou higromicina, sob controle do promotor 35 S do CaMV, além do gene repórter β-glucuronidase (GUS). Adotar-se-é, também, um esquema de seleção positiva baseada na exressão do gene ipt a partir do T-DNA de mutantes "shooter" de *Agrobacterium tumefaciens*. (Será, também, utilizada a estirpe de Agrobacterium EHA-105, contendo os plasmídios pCAMBIA 1301 ou pCAMBIA 2301 (Cambia, Austrália). Esses vetores contêm os genes da neomicina fosfotransferase II (nptII) ou higromicina fosfotransferase II (hptII), sob controle do promotor nopalina sintase (nos), e β-glucuronidase (gus), sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Os genes da rota biossintética de carotenóides Psy, Pds, Zds e Lcy-B, derivados de C. paradisi, foram inseridos nesses vetores sob o controle dos promotores constitutivos CaMV 35S ou FMV 34S.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Laboratório de Cultura de Tecidos e Transgênicos (LCTI), ambos localizados no BIOAGRO.

Medidas de biossegurança adotadas: Todo o trabalho com PGMs ainda está sendo realizado em laboratório, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano e vegetal. Após a sua manipulação, todos os materiais incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Uma vez obtidas plantas geneticamente modificadas *in vitro*, estas serão aclimatadas em casa de vegetação devidamente adaptada e em condições de confinamento. Posteriormente, iremos submeter uma proposta ao CTNBio para liberação planejada de PGMs no meio ambiente.

Equipe envolvida: Wagner Campos Otoni (Líder); Lorena Melo Vieira; Leidy Yibeth Deantonio Florido; Marcio Gilberto Cardoso Costa; Elisonete Ribeiro Garcia Lani.

Órgão financiador: CNPq e FAPEMIG

5.1.5. Transformação genética de ginseng brasileiro (*Pfaffia* sp.), urucum (*Bixa orellana* L.) e arruda (*Ruta graveolens*) mediada por Agrobacterium rhizogenes

O objetivo é a produção de raízes transformadas de *Pfaffia* sp. e de urucum a avaliação do potencial de produção de metabólitos ativos, dentre eles a beta-ecdisona e bixina. Raízes transformadas serão cultivadas em culturas líquidas sob agitação orbital. Os processos de transformação serão a partir da agro-infecção de segmentos caulinares de acessos de *Pfaffia* estabelecidos *in vitro* e de plântulas estabelecidas *in vitro* a partir da germinação de sementes de urucum variedades 'UESB 15', 'UESB 53' e 'SBCN 06' (cedidas pela UESB), de 'Piave Vermelha' (cedida pela empresa Christian-Hansen do Brasil), e de genótipos M1, M2 e M6 da variedade 'Bico de Pato' mantidas na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal/UFV.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Raízes de *Pfaffia*, arruda e de urucum transformadas serão obtidas a partir da inoculação de explantes nodais de *Pfaffia* com *Agrobacterium rhizogenes* R1601, a qual possui o plasmídeo pRiA4b com o gene quimérico nptII inserido no fragmento 21 do TL-DNA obtido pela HindIII, juntamente com o plasmídeo pTVK291, in trans, conferindo à bactéria o fenótipo de supervirulência. As raízes são mantidas em meio MS 100 mg L-1 de canamicina.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos e Laboratório de Cultura de Tecidos e Transgênicos (LCTI), ambos localizados no BIOAGRO.

Medidas de biossegurança adotadas: Todo o trabalho com PGMs ainda está sendo realizado em laboratório, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano e vegetal. Após a sua manipulação, todos os materiais incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Uma vez obtidas plantas geneticamente modificadas *in vitro*, estas serão aclimatadas em casa de

vegetação devidamente adaptada e em condições de confinamento. Posteriormente, iremos submeter uma proposta ao CTNBio para liberação planejada de PGMs no meio ambiente.

Equipe envolvida: Wagner Campos Otoni (Líder); Marcio Gilberto Cardoso Costa; Elyabe P. Matos; João Paulo Correa; Denise Fernandes; Maria Catarina Megumi Kasuya; Elisonete Ribeiro Garcia Lani.

Órgão financiador: CNPq e FAPEMIG

5.1.6. Produção de fitase (mio-inositol hexacisfosfato fosfohidrolase) e tanase (tanino acil hidrolase) por linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum*

Fitase e tanase têm sido aplicadas na indústria de alimentos, química, farmacêutica, de nutrição animal e tratamento de resíduos. *Penicillium griseoroseum* caracteriza-se por não apresentar proteases secretadas no sobrenadante da cultura, como também não produzir micotoxinas e possuir um sistema de secreção eficiente, o que o qualifica como hospedeiro para expressão de proteínas heterólogas. Para obter as linhagens transformadas com alta produção, vetores de expressão contendo os genes que codificam fitase e tanase foram construídos, sendo que a expressão dos genes está sob o controle de um promotor forte e constitutivo. Estes vetores foram utilizados para co-transformar a linhagem mutante *P. griseoroseum* PG63 nia-. Desta forma, o objetivo desta proposta foi obter linhagens de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de fitase e tanase utilizando meio de cultivo, contendo sacarose comercial ou caldo de cana, substratos de baixo custo, o que irá representar um diferencial para produção em escala industrial.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Receptor*: Penicillium griseoroseum* PG63. Parental*: Penicillium chrysogenum; Penicillium expansum* (organismos doadores). Dois genes (*fae* -1643 pb e *tan* - 1743 pb) que codificam proteínas pertencentes à superfamília tanase isolados a partir da linhagem *Penicillium chrysogenum* 1273. O gene *phy*, que codifica fitase em *Penicillium chrysogenum* CCT 1273. O gene *carb*, isolado de *Penicillium expansum* GF, codifica uma carboxilesterase.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos (BIOAGRO).

Medidas de biossegurança adotadas: Fungos esporulante, não patogênico. Utilização de capela de fluxo laminar. Descarte do micro-organismo feito após autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

Equipe envolvida: Elza Fernandes de Araújo (Coordenadora); Denise Mara Soares Bazzoli; Marisa Vieira de Queiroz; Janaina Aparecida Teixeira; Marina Fassarella; Thamy Lívia Ribeiro Corrêa; Mariane Paludetti Zubieta

Artigos: - Ribeiro Corrêa TL, de Queiroz MV, de Araújo EF. Cloning, recombinant expression and characterization of a new phytase from Penicillium chrysogenum. Microbiol Res. 2015 Jan;170:205-12. doi: 10.1016/j.micres.2014.06.005.

- Corrêa TL, Zubieta MP, Teixeira JA, de Queiroz MV, de Araújo EF. Carboxyl ester hydrolase from Penicillium expansum: cloning, characterization and overproduction by Penicillium griseoroseum. J Appl Microbiol. 2013 Jul;115(1):114-24. doi: 10.1111/jam.12215.

5.1.7. Expressão de genes sintéticos que codificam os peptídeos sintéticos SBm7462 e SBbo23290 em *Pichia pastoris* e *Arabidopsis thaliana*.

Os peptídeos sintéticos SBm7462 e SBbo23290 são formados por 45 aminoácidos provenientes da proteína BM86 do carrapato *Rhipicephalus(B.) microplus* e da RAP-1 de *Babesia bovis* respectivamente. Os dois peptídeos são usados como imunógenos para o controle do carrapato e da babesiose transmitida pelo mesmo. A transfecção para levedura é feita para obter mais proteína a menor custo e a fermentação para similar futura produção industrial no País. A transfecção para planta é para dominar o modelo de produção de peptídeos recombinantes expressos em plantas. O produto da levedura já foi testado em bovinos em “stall test” e o produto da planta foi testado em camundongos.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: A levedura *Pichia pastoris* e a planta modelo *Arabidopsis thaliana* serão transformadas com os plasmídeos pPIC9, pPIC9k e pDONR201 que expressam os peptídeos sintéticos SBm7462 e SBbo23290. Os genes doadores são sintéticos, e foram desenhados no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores e sintetizados pela Entelechon (Alemanha) e pela GeneScript (USA).

Nível de contenção: NPB-1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores/BIOAGRO.

Medidas de biossegurança adotadas: Registro de todo material geneticamente modificado desenvolvido; acesso restrito às áreas de manipulação de OGMs; sinalização indicando a experimentação com OGM: autoclavagem de todo material, micro-organismos e organismos GM antes do descarte apropriado.

Equipe envolvida: Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo (Líder); Leandro Silva de Araújo; Cintia Fidelis; Gabriel Tafur; Karlos Kals; Adriana Henao; Matheus Loureiro; Marcio Alberto Mendes.

Órgão financiador: FAPEMIG

5.1.8. Silenciamento de genes por RNA de interferência, e identificação de proteínas secretadas pelo sistema de armadilha de sinal de secreção em leveduras, no estudo da interação *Colletotrichum lindemuthianum - Phaseolus vulgaris*.

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose, é um dos patógenos com maior ocorrência e que causa danos expressivos à cultura do feijão-comum. Em condições de umidade e temperatura favoráveis ao estabelecimento da doença, as perdas podem atingir 100%. A compreensão dos mecanismos genéticos e fisiológicos envolvidos na interação planta/patógeno pode ser útil na estruturação de novos e eficientes métodos de controle à doença, já que a utilização de cultivares resistentes apresenta limitações decorrentes da enorme variabilidade genética presente neste fungo. Desse modo, nos últimos anos, o Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos do Departamento de Microbiologia da UFV (Universidade Federal de Viçosa), vêm desenvolvendo trabalhos relacionados à caracterização estrutural e funcional de genes de patogenicidade do fungo *C. lindemuthianum*. Tradicionalmente, a análise da função dos genes envolvidos na interação de um patógeno com seu hospedeiro têm sido realizada pelo estudo de alterações fenotípicas ou bioquímicas de organismos contendo uma mutação no gene de interesse. Entretanto, hoje, com a crescente disponibilidade de sequências de genomas inteiros, busca-se a utilização de ferramentas que permitam uma análise mais rápida e se possível em larga escala, de modo que a função biológica de uma

determinada proteína possa ser acessada e compreendida em um curto intervalo de tempo. De fato, muitas técnicas têm respondido à essa expectativa, e o silenciamento por RNA de interferência têm se destacado nos últimos anos para esse tipo de estudo em fungos fitopatogênicos, complementando, e muitas vezes substituindo as técnicas tradicionais de inativação insercional. Neste contexto, este trabalho tem por objetivo demonstrar a presença do mecanismo de silenciamento pós-transcricional mediado por RNA em *C. lindemuthianum*, utilizando-o para estudar funcionalmente diferentes genes de patogenicidade.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* será transformado com os plasmídeos pSM1, pSilentDual, pTroya, contendo os genes eGFP – Proteína verde fluorescente (isolado de *Aequorea victoria*); o gene hph – Resistência à higromicina (isolado de *Escherichia coli*) e o gene nptII – resistência à geneticina (isolado de Escherichia coli).

Nível de contenção: NBP-1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos/ BIOAGRO.

Medidas de biossegurança adotadas: Registro de todo material geneticamente modificado desenvolvido; acesso restrito às áreas de manipulação de OGMs; sinalização indicando a experimentação com OGM; autoclavagem de todo material e micro-organismos GM antes do descarte apropriado.

Equipe envolvida: Marisa Vieira de Queiroz (Líder); Denise Mara Soares Bazzolli; Elza Fernandes de Araújo; Sérgio Hermínio Brommonschenkel; Guilherme Bicalho Nogueira.

Órgão financiador: FAPEMIG

5.2. Projetos em andamento:

5.2.1. Identificação de potenciais alvos antigênicos do Mycoplasma Hyopneumoniae e desenvolvimento de vacinas quiméricas: estudo do potencial imunogênico de resposta padrão Th1 em modelos murinos e suínos

Mycoplasma hyopneumoniae é considerado o causador primário da pneumonia enzoótica suína (PES), doença crônica e altamente contagiosa. A infecção por esta bactéria acarreta consideráveis perdas econômicas à produção de carne suína devido,

principalmente, à significativa perda de peso dos animais, gastos com tratamento e redução de preços das carcaças. As manifestações clínicas associadas à infecção pelo agente têm sido frequentes e comuns nas principais regiões produtoras do país, o que acarreta diminuição da produtividade e grandes prejuízos econômicos ao setor nacional e estadual. Em termos práticos, a grande maioria das granjas comercias no Estado e no Brasil são infectadas pelo Mycoplasma Hyopneumoniae. Atualmente existem vacinas comercias de tecnologia importada, utilizando cepas não isoladas no Brasil que são baseadas em bacterinas preparadas a partir de células inativas do microorganismo, na qual é responsável por uma proteção parcial. Desta forma, a campo é comum falhas na vacinação, frequentemente associada à falta de proteção cruzada entre cepas encontradas em vacinas e cepas de campo. Considerando a experiência de parte da equipe em vacinologia de suínos, que recentemente em parceria com a FAPEMIG desenvolveu uma vacina contra circovirose suína (processo de transferência tecnológica – Empresa Ourofino – Patente: PI1020130018) o projeto objetiva desenvolver antígenos recombinantes como candidatos a vacinas de forte resposta imunológica, em especial resposta celular (Th1), contra o Mycoplasma Hyopneumoniae, também passível patenteamento, escalonamento e transferência tecnológica.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: O material genético incluído nos OGMs (Escherichia coli BL21) refere-se a sequência de nucleotideos que codifica a a proteína P97 adesina da bactéria ao vetor de expressão PET-29a Novagem®.

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitida somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microorganismos transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a

experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Abelardo Silva Júnior (Líder); Márcia Rogéria de Almeida; Gustavo Costa Bressan; Maria Aparecida S. Moreira.

5.2.2. Obtenção de soja [Glycine max (L.) Merrill] geneticamente modificada para a composição da fração óleo.

O objetivo deste trabalho é a obtenção de cultivares de soja geneticamente modificados que apresentem silenciamento dos genes que codificam para as enzimas oleoil dessaturase, colina fosfotransferase ou lisofosfatidilcolina aciltransferase, envolvidas na biossíntese de ácidos graxos, visando aumentar o teor de ácido oléico e diminuição de ácido linolênico. Serão utilizados três processos de PTGS (silenciamento gênico pós-transcricional): co-supressão, RNA antisenso e RNA de interferência. Os processos de transformação serão realizados com embriões somáticos, cotilédones imaturos e nós cotiledonares de soja infectados por A. tumefaciens (LB4404) e mediados por sonicação. O teor de ácidos graxos do óleo em plantas transformadas será medido por cromatografia gasosa.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Estas cultivares de soja estão sendo transformadas com os seguintes genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos: oleoil dessaturase, colinafosfotransferase ou lisofosfatidilcolina aciltransferase. Estes genes estão clonados em vetores da série pCAMBIA e pKANNIBAL utilizados especificamente para transformação genética via Agrobacterium tumefaciens. No pCAMBIA, o T-DNA apresenta, além do gene de interesse, marcadores seletivos para antibióticos (canamicina e higromicina) e/ou herbicida (fosfinotricina), além do gene repórter GUS (b-glucoronidase). A expressão de todos os genes está sob o controle do promotor do vírus do mosaico da couve-flor (35S) ou do promotor do gene que codifica para a subunidade alfa da enzima beta-conglicinina (7S), específico de semente.

Nível de contenção: NB-P 1

Medidas de biossegurança: Ainda não foram obtidas plantas transgênicas regeneradas. Todos os embriões de soja submetidos à transformação estão sendo

mantidos in vitro, em sala de cultivo. Posteriormente, as plantas transformadas serão mantidas em casa de vegetação OGM para aclimatização. Após identificação das plantas que contenham as características de interesse, estas serão disponibilizadas para o Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro/UFV.

Equipe envolvida: Maurilio Alves Moreira (Líder); Everaldo Gonçalves de Barros; Wagner Campos Otoni; Andreia Barcelos Passos Lima; Polyana Kelly Martins; Beatriz de Almeida Barros; Cassiana Severiano de Sousa; Lílian da Silva Fialho.

Órgão financiador: FAPEMIG e CNPq.

5.2.3. Patogenicidade de *Colletotrichum spp*. ao cafeeiro.

O gênero Colletotrichum é considerado o agente causal de várias doenças em uma ampla gama de hospedeiros. Em cafeeiro, *C. gloeosporioides* está associado à seca de folhas e frutos, embora ainda não tenha sido possível comprovar sua patogenicidade, uma vez que os sintomas não aparecem após a inoculação. Diante disso, existe a hipótese de que *C. gloeosporioides* seja endofítico ao cafeeiro, podendo causar doenças quando a planta é submetida a determinadas condições de estresse. A fim de esclarecer a interação entre *C. gloeosporioides* e cafeeiro, se endofítica ou patogênica, isolados provenientes de *Coffea arabica* e *C. canephora*, com sintomas de necrose e de mancha manteigosa, foram marcados com o gene GFP, que codifica para uma proteína verde fluorescente. Esta ferramenta permite monitorar o crescimento do fungo in vivo, sem qualquer intervenção externa, fornecendo informações sobre o seu desenvolvimento in situ.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *Colletotrichum gloesporioides*, *C. acutatum*, E. coli contendo o plasmídeo pSM1. Isolados do fungo *Colletotrichum gloeosporioides e C. acutatum*, geneticamente marcados com GFP (green fluorescent protein), pela transformação com o plasmídeo pSM1.

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: 1. Acesso ao laboratório restrito ao pessoal credenciado junto ao Bioagro, controlado pelo pesquisador principal. 2. Todas as manipulações envolvendo OGM são realizadas em câmara de fluxo laminar. 3. Todo

material contendo OGM é esterilizado antes do descarte, por meio de adição de hipoclorito de sódio (material líquido) ou autoclavagem (material sólido)

Equipe envolvida: Eunize Maciel Zambolim (Líder); Eveline Teixeira Caixeta; Laércio Zambolim; Marisa Vieira Queiroz; Ney Sussumu Sakiyama; Rejane do Livramento Freitas.

Órgão financiador: FAPEMIG

5.2.4. Aplicações da filogeografia molecular para a reconstrução da história evolutiva de organismos de importância agrícola do estado de Minas Gerais.

Este plano de trabalho está focalizado no desenvolvimento e aplicação da filogeografia molecular para reconstruir a história evolutiva de organismos de importância agrícola no Brasil, com ênfase no Estado de Minas Gerais, e em treinar recursos humanos na área molecular aplicada a agropecuária. O objetivo a longo prazo é gerar conhecimentos científicos e tecnológicos que poderão ser aplicados na elaboração de novas estratégias de controle e monitoramento de pragas e doenças, de prospecção de germoplasma e de conservação da biodiversidade. O plano de trabalho dará continuidade aos projetos tecnicos-científicos atualmente em andamento, sub coordenação do proponente, os quais investigam (i) a filogeografia molecular de fitopatógenos (ferrugem da soja - Phakopsora pachyrhizi, e crestamento foliar de Cercospora em soja - Cercospora kikuchii) e pragas (caruncho do feijao - Acanthoscelides obtectus, e caruncho do milho - Sitophilus zeamais) e (ii) a filogeografia molecular de espécies nativas (cedro - Cedrela fissilis e angicos - Anadenanthera).

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: E. coli DH5alfa, Carapichea ipecacuanha, Anadenanthera colubrina, Cedrela fissilis, Cercospora sojina, Phakopsora pakhirizi, Acanthoscelides obtectus, Sitophilus zeamais. Fragmentos de DNA oriundos de PCR visando clonagem para fins de sequenciamento de DNA (genes clonados: ITS, trnT-trnL)

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: Registro de todo material geneticamente modificado desenvolvido; acesso restrito às áreas de manipulação de OGMs;

sinalização indicando a experimentação com OGM; autoclavagem de todo material e micro-organismos GM antes do descarte apropriado.

Equipe envolvida: Luiz Orlando de Oliveira (Pesquisador principal); Maira C. M. Freire; Magali G. Garcia; Maria Roméria da Silva; Christina Cleo Vinson; Vanderson Ricardo Jorge; Amanda Teixeira; Juliana Benevenuto; Ana Paula Gomes Soares.

Órgão financiador: International Foundation for Science (IFS)

5.2.5. Caracterização molecular de apirases de espécies do gênero leishmania, expressão heteróloga dos parálogos de Leishmania (Viannia) braziliensis e potencial aplicação no imunodiagnóstico da leishmaniose canina.

As enzimas E-NTPDases são enzimas capazes de hidrolisar nucleotídeos tri e/ou difosfatados, que podem ser degradados a nucleosídeos por outras ectonucleotidases. Os nucleotídeos extracelulares atuam como sinalizadores em vários processos celulares, como modulação da resposta imune de hospedeiros mamíferos. A hidrolise do ATP extracelular possui papel na infectividade e virulência do Leishmania, bem como para outros parasitos. Pelos motivos supracitados este projeto possui como objetivo geral o estudo do papel das ectonucleotidases na hidrólise real de nucleotídeos extra-celulares em Leishmania sp. e avaliarmos sua utilização biotecnológica. Propomos então a caracterização molecular dos genes codificantes.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Escherichia coli BL21 (DE3), Leishmania braziliensis. O material genético incluído no OGM (Escherichia coli BL21) refere-se a sequência de nucleotideos que codifica a enzima NTPDASE I de Leishmania (Viannia) braziliensis, ligado ao vetor de expressão PET-21b Novagem.

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitida somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microorganismos transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida

área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo; Ronny Francisco de Souza; Yaro Lucíolo dos Santos; Luciano Gomes Fietto.

Órgão financiador: FAPEMIG.

5.2.6. Desenvolvimento de protótipos de kits de diagnóstico rápido por imunocromatografia para Leishmaniose e Dengue para uso em grande escala e condições de campo.

O principal objetivo deste projeto é o desenvolvimento de protótipos de kits para diagnóstico rápido de Leishmaniose e Dengue, por imunocromatografia, para serem usados futuramente em testes de campo para agilização de diagnóstico em casos de suspeita destas infecções e uso em escala maior para inquéritos epidemiológicos. Abaixo seguem os objetivos específicos deste projeto. A) Desenvolver tecnologia nacional com perspectiva de exportação. B) Oferecer alternativas nacionais inovadoras para o diagnóstico de leishmaniose e dengue que sejam mais rápidos e práticos. C) Satisfazer a necessidade do mercado e atender demanda latente da área médica e veterinária (neste último caso exclusivamente no caso da leishmaniose por ser uma zoonose). D) Fortalecer a possível comercialização da patente sobre o uso da E-NTPDases recombinantes de Leishmania sp. E) Testar os protótipos de kits de diagnóstico em um estudo retrospectivo em soroteca humana e de cães.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *Escherichia coli* BL21

Nível de contenção: NB-P 1

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microrganismo transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais

seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Ronny Francisco de Souza; Sidimar Sossai; Marilane de Oliveira Fani Amaro; Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo; Sérgio Oliveira de Paula.

Órgão financiador: FAPEMIG.

5.2.7. Avaliação do potencial vacinal da proteína recombinante do capsídeo do Circovirus suíno 2 e estudo epidemiológico do vírus no Brasil.

Este projeto se propõe a avaliar o potencial antigênico de partidas vacinais contendo a proteína recombinante do capsídeo do PCV2 em modelo murino, e a realizar testes de campo. O grupo de Infectologia Molecular Animal da Universidade Federal de Viçosa desenvolveu um sistema de expressão heteróloga da proteína do capsídeo viral do PCV2 em bactérias Escherichia coli. Este sistema foi capaz de expressar eficientemente a proteína recombinante. A expectativa deste trabalho é possibilitar a produção de uma vacina recombinante que contribua para o controle eficiente da infecção pelo PCV2 no Brasil.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *Escherichia coli* BL21 e Circovírus suíno 2

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: No Laboratório de Infectologia Molecular Animal são efetuadas análises de produtos de PCR e material genético clonado em plasmídeo (material sem nenhuma capacidade regenerativa dos OGMs) e, ou, condições de escape gênico. As amostras são manipuladas empregando-se técnicas de assepsia comuns a laboratórios de microbiologia e biologia molecular (uso de chama, capela de fluxo laminar, dentre outros procedimentos). Todo o material que necessite de descarte é submetido a processo de autoclavagem e, quando pertinente, a incineração. A referida área de trabalho possui um livro de registro de informações

(caderno de protocolo) sobre os experimentos em andamento, assim como registro de controle e documentação de todo o trânsito de entrada/saída de amostras para análise. O estoque dos micro-organismos geneticamente modificados está armazenado e congelado a -80ºC. O material genético clonado (DNA do vírus) está estocado em freezer a -20ºC, todos identificados com o símbolo de risco biológico na porta. Esta instalação está sendo e será utilizada para as experimentações propostas. O acesso ao Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA), é permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais são informados previamente sobre as normas de biossegurança. Pequenos equipamentos e materiais de consumo utilizados no experimento são de uso exclusivo deste laboratório. A porta de acesso é mantida trancada, exceto quando houver pessoas autorizadas trabalhando no seu interior. Há uma sinalização na entrada do laboratório, e nos equipamentos, indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs, são informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo(Líder); Abelardo Silva Júnior; Juliana Lopes Rangel Fietto; Ethel Fernandes de Oliveira Peternelli; Mariana Costa Fausto; Rafael Locatelli Salgado; Sthefany Patareli; Josicelli Souza Crispim.

Órgão financiador: CNPq.

5.2.8. Identificação de genes e proteínas de interesse biotecnológico em Leishmania através de análise transcriptômica e genômica comparativa.

Objetivou-se neste trabalho analisar o genoma das espécies de Leishmania disponíveis em bancos de dados públicos (L. major, L. braziliensis e L. infantum) para identificar e classificar proteínas comuns destas espécies que não estão presentes nos hospedeiros vertebrados, bem como estabelecer vias metabólicas dependentes entre parasito e hospedeiro.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: O material genético incluído nos OGMs (Escherichia coli BL21) refere-se a sequência de nucleotideos que codifica a enzima NTPDASE do parasito Leishmania ligado ao vetor de expressão PET-21b Novagem®.

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microorganismos transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Talles Eduardo Ferreira; Márcia Rogéria de Almeida; Luís Carlos Crocco Afonso; Fabio Ribeiro Cerqueira.

5.2.9. Produção de hibridomas para obtenção de anticorpos monoclonais contra a proteína E-NTPDase2 (Nucleosídio Difosfatase) de *Leishmania amazonensis*.

As ATP-difosfohidrolases (E.C. 3.6.1.5), comumente chamadas de apirases ou E-NTPDases, hidrolisam ligações pirofosfato de nucleosídeos di- e trifosfatados, na presença de cátions divalentes, com liberação de ortofosfato e NMP. Diversas E-NTPDases já foram descritas na interface com o hospedeiro de diversos parasitas humanos, seja localizadas na membrana externa do parasita ou secretadas. O objetivo geral deste projeto é obter hibridomas produtores de anticorpos monoclonais contra a NTPDase2 de Leishmania amazonensis, que sejam capazes de reconhecer de forma específica a isoforma NTPDase2 em relaçao à NTPDase1. Além disto, esperamos obter também algum anticorpo que seja espécie-específico em relação aos parálogos de L. major, L. chagasi e L. braziliensis.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: O material genético incluído no OGM (Escherichia coli BL21) refere-se a sequência de nucleotideos que codifica a enzima NTPDASE I do parasito Leishmania amazonensis, ligado ao vetor de expressão PET-21b Novagem®.

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: Em relação ao acesso, a área em regime de contenção será permitido somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho, os quais serão informados previamente sobre as normas de biossegurança. A manipulação/descarte de material que entraram em contato com o microorganismos transformado será realizada seguindo os mais exigentes padrões de contenção, com recipientes destinados exclusivamente ao descarte destes materiais seguido de autoclavagem e por fim eliminação dos resíduos por incineração. A referida área de trabalho possuirá um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e haverá uma sinalização na entrada do laboratório indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs serão informados à CIBio da instituição.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Líder); Ronny Francisco de Souza; Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo; Joaquin Hernán Patarroyo Salcedo; Sérgio Oliveira de Paula.

Órgão financiador: FAPEMIG.

5.2.10. Silenciamento de genes envolvidos na síntese de oligossacarídeos de rafinose em sementes de soja.

O objetivo deste projeto é o silenciamento gênico das enzimas estaquiose sintase e/ou rafinose sintase em semente de soja, via interferência por RNA, e avaliação dos efeitos do silenciamento nas plantas de soja transformadas. Uma vez que estas enzimas estão envolvidas nas etapas finais da via de síntese dos RO, esta estratégia poderia reduzir o conteúdo de RO, via silenciamento gênico semente-específico, sem causar alterações drásticas no metabolismo da planta. Nossa meta é a obtenção de uma variedade de soja com baixa concentração de RO, com maior valor nutricional, destinada a alimentação humana e animal.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: *Escherichia coli* DH5α, *Escherichia coli* BL21*, Pichia pastoris* e *Glycine max* L. Merril.

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: O trabalho com o micro-organismo é feito em capela de fluxo vertical laminar.Todo material de trabalho utilizado como o micro-organismo, assim como, o micro-organismo são descartados após o procedimento de esterilização em autoclave, à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Equipe envolvida: Sebastião Tavares de Rezende (Líder); Ana Paula Gomes Soares; Lídia Nascimento Queiroz; Everaldo Gonçalves de Barros; Valéria Monteze Guimarães.

Órgão financiador: CNPq e FAPEMIG.

5.2.11. Construção de linhagens de Kluyveromyces lactis Δku80 hospedeiras para produção de proteínas recombinantes: Análise da expressão da fusão estreptavidina-Pectina liase.

Linhagens de K. lactis hospedeiras para a expressão de proteínas recombinantes eficientes na via de recombinação homóloga foi submetida a mutação do gene KU80. A deleção deste gene foi feita utilizando a técnica Split-Marker. O gene da pectina liase (plg1) de Penicillium griseoroseum foi clonado nos vetores pKLAC1 (NewEngland BioLab) e pKLAC1/cStp (lab Fisiolgia de Microrganismo –BIOAGRO) contendo o domínio de afinidade da estreptavidina pela biotina, para avaliar a capacidade de linhagens de K. lactis em produzir e secretar a proteína recombinante.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Receptor: Kluyveromyces lactis. Doador: Penicillium griseoroseum. Levedura Kluyveromyces lactis mutantes para o gene KU80; Vetores de expressão pKLAC1 (New England BioLab) e pKLAC1/cStp com o gene da pectina liase do fungo filamentoso Penicillium griseoroseum; Células de Escherichia coli portadoras dos vetores pKLAC1/Plg1.

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: Manipulações de DNA são realizadas com luva, em local apropriado e separado no laboratório de Genética de Microrganismos e de Fisiologia de Microrganismos do BIOAGRO, sendo os materiais manipulados lavados também com luva, e o material descartado, como reagentes de kits de DNA, de purificação, e géis de agarose, descartados em local apropriado no próprio laboratório para posterior coleta com indicativo do fator de risco 1. As ponteiras utilizadas para manipulação dos microrganismos são sempre autoclavadas para posterior descarte,

assim como os meios sólido e líquido contendo culturas microbianas utilizadas no trabalho.

Equipe envolvida: Flávia Maria Lopes Passos (Líder); Lívia Tavares Colombo e Júlio César Câmara Rosa.

Órgão financiador: CNPq e FAPEMIG.

5.2.12. EFETORÔMICA: Utilização de abordagens genômicas integradas na identificação e análise funcional de efetores de fungos causadores de ferrugens visando o desenvolvimento de variedades de plantas com resistência durável.

Os fungos Hemileia vastatrix (ferrugem do cafeeiro), Phakopsora pachyrhizi (ferrugem da soja) e Puccinia psidii (Ferrugem do eucalipto) causam doenças de grande importância econômica para o agronegócio e setor florestal brasileiro. Durante a interação com o hospedeiro, esses parasitas obrigatórios secretam proteínas efetoras que atuam no apoplasto (efetores extracelulares) ou no citoplasma da célula vegetal (efetores citoplasmáticos) onde suprimem as respostas de defesa da planta e promovem mudanças na fisiologia da planta que favorecem a patogênese. O objetivo desse projeto é a elaboração de um catálogo de genes efetores destas ferrugens que são expressos em momentos determinantes do fenótipo das interações por meio da análise transcritômica utilizando a tecnologia de pirosequenciamento, análises de bioinformática, análises funcionais em genótipos resistentes e suscetíveis das plantas hospedeiras e análises genômicas comparativas. Esses estudos permitirão identificar genes de resistência que reconhecem efetores conservados nas três espécies de ferrugens sendo, portanto, mais difíceis de serem suplantados por estes patógenos.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Receptor: Escherichia coli, Saccharomyces cerevisae e Agrobacterium tumefaciens. Doador: Fungos basidiomicetos: Hemileia vastatrix, Puccinia psidii e Phakopsora pachyrhyzi. cDNAs que codificam proteínas secretadas pelos fungos Hemileia vastatrix, Puccinia psidii e Phakopsora pachyrhizi identificados por meio do sequenciamento de clones de bibliotecas de cDNA da interação ou pela utilização do sistema armadilha de secreção em leveduras. As ORFs completas serão inicialmente clonadas no vetor pGEMT-Easy, utilizando como receptor E. coli. A seguir, as ORFS com ou sem a seqüência

codificadora do peptídeo sinal de secreção são reclonadas no vetor pYST1 e transformadas em S. cerevisae para confirmação na secreção neste sistema. Os genes que codificam proteínas secretadas serão transferidos para cassetes de expressão plasmidial ou de expressão baseado no T-DNA, de forma que a expressão dos genes seja direcionada pelo promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor. Experimentos de agroinfiltração (cassete baseado no T-DNA) e cobombardeamento (cassete plasmidial) em folhas de genótipos resistentes e suscetíveis serão efetuados para identificar genes efetores que codificam proteínas efetores reconhecidas por genes de resistência no hospedeiro homólogo das ferrugens.

Nível de contenção: NB-P 1.

Medidas de biossegurança adotadas: Os organismos geneticamente modificados são manipulados no Laboratório de Genômica (BIOAGRO) que possui a infraestrutura necessária para o crescimento, manipulação, armazenamento e descarte destes OGMs do Grupo I. Os OGMs são manipulados em capelas de fluxo laminar e câmaras de crescimento em placas de petri descartáveis, e todo o material descartado é tratado com água sanitária, ou autoclavado, antes do descarte. Todos os clones OGMs obtidos no laboratório são registrados em caderno de ata e em caderno de registro de clones do laboratório, onde recebem uma sigla e numeração sequencial. Os estudos funcionais são efetuados em folhas destacadas armazenadas em germplox e mantidas em câmaras de crescimento. Após as análises, o material vegetal inoculado ou bombardeado é destruído por autoclavagem. O uso de jaleco, luvas e demais procedimentos são obrigatórios para todas as pessoas que trabalham no Laboratório de Genômica. O laboratório possui uma capela de exaustão para manuseio de produtos químicos tóxicos, e o corredor de uso comum possui lavatório de olhos e extintores de incêndio. Resíduos químicos são armazenados na capela de exaustão e recolhidos periodicamente por firma contratada pela UFV e destruídos por incineração.

Equipe envolvida: Sérgio H. Brommonschenkel (Líder); Gilson Azevedo; Michelle Byer; Natalia Penido; Thiago Maia; Valeria Yukari Abe; Judas Tadeu do Rosário de Castro Silva.

Órgão financiador: CNPq.

5.2.13. Expressão heteróloga de genes que codificam enzimas lignocelulolíticas na linhagem hospedeira Kluyveromyces.

No presente projeto será construída uma biblioteca metagenômica a partir de um consórcio microbiano termofílico isolado em nosso laboratório e será efetuado um screening dessa biblioteca por ensaios enzimáticos de celulases, hemicelulases, lacases e peroxidases. Os insertos dos clones positivos serão sequenciados e clonados num vetor de expressão integrativo para K. marxianus. Será obtida uma linhagem de K. marxianus UFV-3 mutante para o gene MNN10 na qual os genes selecionados e clonados no vetor de expressão serão usados para transformar a linhagem K. marxianus UFV-3 mutante. Os transformantes com alta velocidade de crescimento a altas temperaturas serão selecionados em cultura contínua, e porteriormente será efetuada a análise da expressão e secreção das enzimas lignocelulolíticas recombinantes.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Receptor: Levedura Kluyveromyces marxianus. Parental: Kluyveromyces marxianus. Genes que codificam enzimas lignocelulolíticas

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos (BIOAGRO).

Medidas de biossegurança adotadas: Todos os procedimentos serão realizados com luvas descartáveis; O local de trabalho estará sempre limpo e qualquer respingo de cultura celular, mesmo não patogênica, será devidamente submetido à limpeza com álcool 70%; Os cultivos celulares serão autoclavados antes de serem descartados; As ponteiras e eppendorfs utilizados para manipulação de DNA serão descartados em lixo separado; Os reagentes tóxicos utilizados para extração de DNA, como fenol, serão descartados juntamente com o lixo separado dos demais laboratórios da microbiologia; As leveduras transformantes serão manipuladas em cabine de fluxo laminar.

Equipe envolvida: Flávia Maria Lopes Passos (Líder); Lívia Tavares Colombo; Caio Roberto Soares Bragança; Wendel Batista da Silveira; Marisa Vieira de Queiroz; Luciano Gomes Fietto.

5.2.14. Produção de kit um de diagnóstico rápido para leishmaniose canina usando antígeno recombinante e imunocromatografia por fluxo lateral.

Este projeto tem como principal objetivo a produção de um protótipo de kit de diagnóstico pelo método de imunocromatografia por Fluxo Lateral (Lateral Flow Test) para Leishmaniose canina. Para isso o projeto prevê a produção heteróloga de um antígeno recombinante de Leishmania infantum chagasi, em sistema procarioto (Escherichia coli) e sua utilização no kit respectivo para uso em diagnóstico rápido de casos suspeitos e para uso a campo em inquéritos e vigilância epidemiológicos em população.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Receptor: E. coli (estirpes BL21::DE3). Parental: Leishmania infantum chagasi. O material genético incluído no OGM (Escherichia coli BL21) refere-se a sequência de nucleotídeos que codifica o ecto-domínio da enzima NTPDase-1e2 do parasito Leishmanoa infantum chagasi, ligado ao vetor de expressão pET-21b Novagem®. As referidas proteínas recombinantes não são tóxicas e serão usadas como antígeno para imunodiagnóstico e proteína vacinal para leishmaniose e para caracterizações bioquímicas.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (BIOAGRO).

Medidas de biossegurança adotadas: Registro de todo material geneticamente modificado desenvolvido; acesso restrito às áreas de manipulação de OGMs; sinalização indicando a experimentação com OGM; autoclavagem de todo material e micro-organismos OGM antes do descarte apropriado.

Equipe envolvida: Juliana Lopes Rangel Fietto (Lider); Márcia Rogéria de Almeida; Gustavo Costa Bressan; Ronny Francisco de Souza.

Órgão financiador: CNPq e FAPEMIG

5.2.15. Identificação e Caracterização de Proteínas Envolvidas na Resposta de Plantas a Infecção por Geminivírus

NIK1 (At5g16000), NIK2 (At3g25560) e NIK3 (At1g60800) são receptores transmembranas do tipo serina/treonina cinase de *A. thaliana* que estão inseridos no

grupo formado por proteínas de defesa. As proteínas NIKs (NSP-interacting kinase) foram identificadas pela sua capacidade de interagir com a proteina NSP de geminivírus. A proteína viral NSP atua inibindo as atividades de autofosforilação e de fosforilação de substratos exógenos de NIK e, portanto, acredita-se, que interfere nas vias de defesa a patógenos mediadas por esse receptor. Dessa forma, a investigação de propriedades bioquímicas de NIK se faz necessária, como a determinação de seus parâmetros cinéticos, bem como a identificação de sítios adicionais de fosforilação na proteína NIK1, bem como da interação de NIK com seus possíveis substratos e a relevância dessa interação na via de defesa antiviral mediada por NIK com utilização potencial como ferramenta de resistência de plantas a infecção viral.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: O cDNA (gene AT5G16000.1) de NIK1-1(*Arabdopsis thaliana* NSP-Interacting Kinase), sob o controle do promotor 35S e fusionado a proteína GFP (green fluorescent protein) foi clonado no vetor binário de transformação de plantas pK7FWG2.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO).

Medidas de biossegurança adotadas: 1. Acesso ao laboratório restrito ao pessoal credenciado junto ao BIOAGRO, controlado pelo pesquisador principal. 2. Todas as manipulações envolvendo PGM são realizadas em câmara de fluxo laminar ou câmara-de-crescimento predeterminadas para esta finalidade. 3. Toda PGM mantida em casa-de-vegetação tem acesso controlado por meio de chave, e todas as flores são eliminadas na fase de botão (antes da primeira antese) a fim de impedir a disseminação de pólen. Material vegetal com finalidade de multiplicação de sementes é mantido em ambiente de contenção a fim de impedir a liberação de sementes ao meio ambiente. 4. Toda PGM é autoclavada antes do descarte, bem como o solo.

Equipe envolvida: Elizabeth Pacheco Batista Fontes (Líder); Francisco Murilo Zerbini; Wagner Campos Otoni; Francisco J. L. Aragão; Anésia Aparecida dos Santos; Elisa C. S. Carvalho; Daniela Côco.

Órgão financiador: FAPEMIG.

5.2.16. Transformação genética de *Brachypodium distichum*, *Passiflora* e *Solanum melongena*

O objetivo é avaliar possíveis modificações morfo-fisiológicas de RNAs pequenos (miRNAs) nos padrões de brotação lateral (arquitetura da planta) plantas regeneradas e aclimatizadas , bem como sobre o desenvolvimento de embriões zigóticos e somáticos de *Brachypodium distychum* e de *Solanum melongena*. Isso será realizado mediante a transformação de calos embriogênicos das duas espécies com construções contendo RNA pequenos (miR156 e miR529 de *Arabidopsis thaliana*) em *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101, EHA 105, LBA 4404 e AGL-1. Há relatos na literatura de que esses miRNAs controlam a heteroblastia e a dominância apical, além de desenvolvimento de frutos.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Serão utilizadas construções visando à superexpressão e silenciamento gênico de miRNAS 156 (p35S:AtMIR156b e o p35S:MIM156b) e miRNA159 (p35S:AtMIR159 e o p35S:MIM159) em Brachypodium, Passiflora e berinjela. As seguintes estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* serão utilizadas: GV 3101, EHA 105, LBA4404 e AGL-1.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Cultura de Tecidos/BIOAGRO

Medidas de biossegurança adotadas: Todo o trabalho com PGMs ainda está sendo realizado em laboratório, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano e vegetal. Após a sua manipulação, todos os materiais incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Uma vez obtidas plantas geneticamente modificadas in vitro, estas serão aclimatadas em casa de vegetação devidamente adaptada e em condições de confinamento, segundo Normas estabelecidas pela CTNBio.

Equipe envolvida: Wagner Campos Otoni (Líder); Fábio Tebaldi Silveira Nogueira; Marcio Gilberto Cardoso Costa; Evelyn Jardim de Oliveira; Lorena Melo Vieira; Geraldo Felipe F. e Silva.

Órgão financiador: FAPEMIG e CNPq.

5.2.17. Tolerância de plantas a estresses bióticos e abióticos

Estudos recentes indicaram que níveis elevados de BiP em *N. tabacum* e soja conferiram tolerância a estresse hídrico durante crescimento da planta. O efeito da hiperexpressão de soyBiPD no acúmulo de proteínas secretórias de defesa e no sistema antioxidativo das plantas de soja está sendo avaliado. Dado o potencial de BiP em regular a via UPR de defesa a estresse do RE e de manter o turgor foliar em plantas transgênicas submetidas a déficit hídrico, a convergências destas vias será analisada por ensaios de microarranjos em soja e consistirão na análise da expressão de milhares de cDNas nas condições referidas de estresses. Tais estudos visam a elucidação das bases moleculares das interações entre células de plantas com seu ambiente, por meio de vias de sinalização conectadas ao retículo endoplasmático.

OGMs sendo desenvolvidos e/ou utilizados no projeto: Região codificadora do gene soyBIPD obtido de soja, obtidos em construções em sentido senso e antisenso clonados em vetores binários sob o controle do promotor 35S do CAMV.

Nível de contenção: NB-P 1. Os experimentos estão sendo realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (BIOAGRO).

Medidas de biossegurança adotadas: 1. Acesso ao laboratório restrito ao pessoal credenciado junto ao Bioagro, controlado pelo pesquisador principal. 2. Todas as manipulações envolvendo PGM são realizadas em câmara de fluxo laminar ou câmara-de-crescimento predeterminadas para esta finalidade. 3. Toda PGM mantida em casa-de-vegetação tem acesso controlado por meio de chave, e todas as flores são eliminadas na fase de botão (antes da primeira antese) a fim de impedir a disseminação de pólen. Material vegetal com finalidade de multiplicação de sementes é mantido em ambiente de contenção a fim de impedir a liberação de sementes ao meio ambiente. 4. Toda PGM é autoclavada antes do descarte, bem como o solo.

Equipe envolvida: Elizabeth Pacheco Batista Fontes (Líder); Francisco Murilo Zerbini; Wagner Campos Otoni; Francisco J. L. Aragão; Humberto Henrique de Carvalho; Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria; Pedro A.B. Reis.

Órgão financiador: FAPEMIG e CNPq.

6. Descrição sobre quaisquer acidentes ou agravos à saúde possivelmente relacionados a trabalhos com OGM e seus derivados e medidas de contingenciamento, controle e prevenção.

Não houve relatos de acidentes ou agravos à saúde relacionados a trabalhos com OGM no decorrer do ano de 2013.

7. Descrição sobre atividades de capacitação em biossegurança de OGM e seus derivados.

No ano de 2013 não houve o oferecimento de cursos de capacitação em biossegurança de OGM e seus derivados.

8. Descrição das medidas de biossegurança que vêm sendo adotadas e sua possível eficiência para evitar danos.

O acesso aos laboratórios é restrito ao pessoal credenciado junto ao Bioagro, controlado pelo pesquisador principal. A área de trabalho possui um livro de registro de informações sobre os experimentos em andamento e há uma sinalização na entrada dos laboratórios indicando a experimentação com OGMs. Todo e qualquer acidente, bem como as informações inerentes aos OGMs são informados à CIBio.

Todo o trabalho com OGM é realizado em laboratórios, devidamente equipados com câmara de fluxo laminar para manuseio de material bacteriano e vegetal ou câmara de crescimento. Todos os procedimentos são realizados com luvas descartáveis. O local de trabalho deve estar sempre limpo e descontaminado. Os reagentes tóxicos utilizados para extração de DNA, como fenol, são descartados separadamente e coletados pela Gerência de Resíduos e Rejeitos Tóxicos da UFV.

A manipulação e/ou descarte de material que entraram em contato com o micro-organismos transformado, incluindo microtubos, ponteiras de micropipetas, vidrarias e placas com meios de cultura são autoclavados antes de serem descartados. Todo OGM é autoclavado antes do descarte.

Em relação ao acesso a casa-de-vegetação, a área em regime de contenção é permitida somente a pesquisadores e funcionários diretamente envolvidos no trabalho com acesso controlado por meio de chave. Todas as flores são eliminadas na fase de botão (antes da

primeira antese) a fim de impedir a disseminação de pólen. Todos os envolvidos no trabalho com OGM são informados previamente sobre as normas de biossegurança segundo estabelecidas pela CTNBio.

9. Citar as liberações ambientais na(s) Unidade(s) com os respectivos números dos Processos na CTNBio:

a. Concluídas: Nada consta

b. Em andamento: Nada consta

c. Suspensas: Nada consta

d. Canceladas: Nada consta

10. Relacionar os relatórios de conclusão dos experimentos de liberação planejada de OGM e seus derivados no meio ambiente que obtiveram decisão técnica e parecer favorável da CTNBio.

Nada consta no ano de 2013.

11. Anexar cópia das atas das reuniões realizadas pela CIBio.

No ano de 2013 foram realizadas 02 reuniões, as quais as atas constam como Anexo 1.

12. Descrever as dificuldades institucionais para o bom funcionamento das atividades da CIBio.

A CIBio não possui estrutura administrativa própria, as reuniões periódicas são realizadas no BIOAGRO e o que é disponibilizado pela Instituição é a secretária, que nos acompanha nas reuniões e nos auxilia em todos os procedimentos operacionais. No ano de 2013 foi aberto o processo nº 018485/2013 pleiteando uma estrutura própria para o estabelecimento definitivo da CIBio, até a presente data o processo se encontra em tramite.

13. Relacionar o material importado (OGM e derivados), relacionando a quantidade importada ao projeto de pesquisa. (Nova redação dada pela Resolução Normativa 14 de 05 de fevereiro 2015).

Não houve relatos de material importado (OGM e derivados) no período de 2013.

14. Informar se houve fiscalização por parte dos órgãos e entidades de registro e fiscalização. Caso afirmativo, indicar a data, equipe fiscalizadora e N.º do Termo de Fiscalização e, se houver, o N.º do Auto de Infração.

No ano de 2013 não houve nenhuma visita por parte dos órgãos e entidades de registro e fiscalização.

15. Informar demais ocorrências que a CIBio julgar necessário relatar à CTNBio.

Nenhuma discordância em relação a norma vigente foi observada em 2013. Vale salientar apenas que o Conselho Universitário da UFV na resolução nº 16/2013 aprovou o Regimento Interno da CIBio/UFV.

16. Informar eventuais alterações na descrição das instalações, anexando a nova planta baixa.

Não houve alterações nas instalações em 2013.

17. Informar todas as exportações e transportes no período coberto pelo relatório.

Não foi relatado a CIBio nenhum pedido de exportação e transporte de OGM no período de 2013.

Data: 26/05/15

_____

Abelardo Silva Junior
Presidente da CIBio/UFV