

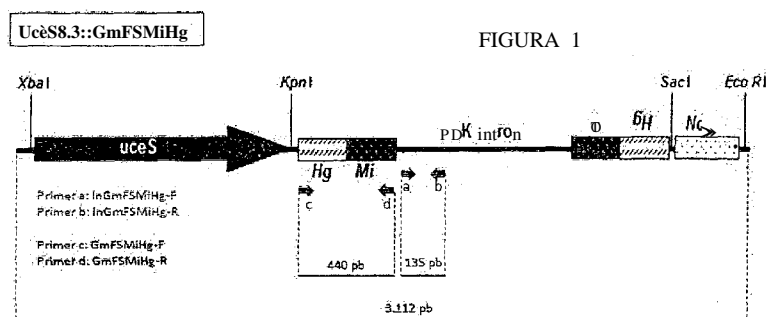


- (51) Classificação Internacional de Patentes :
C12N 15/82 (2006.01)
- (21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR20 13/000203
- (22) Data do Depósito Internacional :
11 de Junho de 2013 (11.06.2013)
- (25) Língua de Depósito Internacional :
Português
- (26) Língua de Publicação :
Português
- (71) Requerente : **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA** [BR/BR];
Parque Estação Biológica - PqEB s/n, Edifício Sede, Plano Piloto, CEP-70770-901 Brasília, DF (BR).
- (72) Inventores : **GROSSI DE SÁ, Maria Fátima**; SCENTR 01, BI. H, apto. 306, Conj. Ilhas do Lago, CEP-70800-1 10 Brasília, DF (BR). **ROMANO DE CAMPOS PINTO, Eduardo**; SCEN trecho 1, conj. 36 Bloco D apt 403 - Asa Norte, CEP-70800-1 10 Brasília, DF (BR). **DA ROCHA FRAGOSO, Rodrigo**; SHTN TR1 CJ2 BL 1-03 Apto 011 - Asa Norte, CEP-70800-200 Brasília, DF (BR). **MATTAR DA SILVA, Maria Cristina**; AOS 2 bloco A Ap. 403 - Octogonal, CEP-70660-021 Brasília, DF (BR). **FERREORA, André Vinícius Julio**; Rua das Figueiras, Ed. Sofisticatto apt. 804B, Águas Claras, CEP-71906-750 Brasília, DF (BR).
- (74) Mandatário : **DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA**; Caixa Postal 2142, Rua Marquês de Olinda, 70, CEP-2225 1-040 Rio de Janeiro, RJ (BR).
- (81) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(Continua na página seguinte)

(54) Title : EXPRESSION CARTRIDGE FOR INDUCING RESISTANCE TO MULTIPLE NEMATOID SPECIES IN PLANTS, METHOD AND PLANTS USING SAID EXPRESSION CARTRIDGE

(54) Título : CASSETE DE EXPRESSÃO PARA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS ESPÉCIES DE NEMATOIDES EM PLANTAS, MÉTODOS E PLANTAS QUE O UTILIZAM



(57) Abstract : The present invention provides expression cartridges for plants, capable of silencing genes of multiple nematoid species that feed on said plants, thus imparting resistance to said nematoid species. More specifically, the expression cartridges according to the present invention can express dsRNA molecules in tissues that are the target of nematoid infestation. Also provided are vectors comprising said expression cartridge, methods for producing a plant that is resistant to multiple nematoid species, and also methods for controlling nematoids in a plantation, plants that are resistant to multiple nematoid species, seed of these plants and products produced from material extracted from said plants.

(57) Resumo : A presente invenção fornece cassetes de expressão em plantas capazes de silenciar genes de múltiplas espécies de nematoides que se alimentam das referidas plantas conferindo resistência às referidas espécies de nematoides. Mais especificamente, os cassetes de expressão da presente

(Continua na página seguinte)





Publicado.

— *sem relatório de pesquisa internacional; será republicado após recepção do mesmo (Regra 48.2(g))* — *com listagem de sequências, parte da descrição (Regra 5.2(a))*

invenção são capazes de expressar as moléculas de dsRNA em tecidos alvo de infestação por nematoides. São fornecidos ainda vetores compreendendo o referido cassete de expressão, métodos para produção de uma planta resistente a múltiplas espécies de nematoides bem como para o controle de nematoides em uma plantação, plantas resistentes a múltiplas espécies de nematoides, suas sementes e produtos produzidos a partir de material extraído das referidas plantas.

**CASSETE DE EXPRESSÃO PARA INDUÇÃO DE RESIS-
TÊNCIA A MÚLTIPLAS ESPÉCIES DE NEMATOIDES EM PLANTAS, MÉ-
TODOS E PLANTAS QUE O UTILIZAM**

Campo da invenção

5 A presente invenção refere-se ao controle de nematoides em plantas. Mais especificamente, a presente invenção refere-se ao controle de múltiplas espécies de nematoides por silenciamento gênico através da expressão de uma molécula de RNA na planta capaz de formar um RNA dupla fita compreendendo um fragmento da sequência de genes alvo da peste.

10 Fundamentos da Invenção

 Fitonematoides estão entre os principais fatores responsáveis pela queda do rendimento de diversas culturas, particularmente a da soja, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais.

 O controle de nematoides em culturas de escala, como a soja, é
15 planejado de modo a integrar vários métodos e apresentar baixo custo. De um modo geral, são considerados os princípios fitopatológicos da exclusão (evitar a infestação de áreas indenens por espécies ou novas raças, na propriedade ou numa região geográfica maior); da erradicação (rotação de cul-
turas com espécies de verão e de inverno não hospedeiras); da regulação
20 (modificação do ambiente e nutrição das plantas); e da imunização (utiliza-
ção de cultivares resistente a determinadas espécies ou raças). As atuais estratégias para controle de nematoides são: uso de nematicidas, rotação de culturas, resistência genética natural e engenharia genética.

 Nematicidas têm sido amplamente utilizados para controle de
25 nematoides parasitas de plantas sedentários e migratórios, mas estes com-
postos são frequentemente associados a efeitos prejudiciais ao meio ambi-
ente.

 A rotação de culturas, uma prática cultural efetiva para muitos
estresses bióticos, também é uma estratégia importante para manejo de
30 nematoides parasitas de plantas, embora, em muitos casos, sua eficácia é limitada.

 O manejo de fitonematoides depende muito da resistência da

planta hospedeira obtida por métodos tradicionais de melhoramento, muitas vezes derivada de uma base genética limitada. O melhoramento convencional, no entanto, apresenta algumas limitações, como por exemplo, a ligação gênica entre genes de interesse e genes indesejáveis e a incompatibilidade interespecífica.

A engenharia genética é uma ferramenta extremamente útil, pois permite a identificação de genes de interesse, manipulação desses genes, a construção e introdução de um único gene de interesse diretamente em cultivares elite e a seleção das plantas que possuem esse gene. O gene a ser introduzido pode ser oriundo da mesma espécie ou de outras espécies, permitindo assim a quebra das barreiras impostas pela incompatibilidade sexual entre as diferentes espécies, além de eliminar o efeito das ligações gênicas indesejadas.

A estratégia de silenciamento gênico, por interferência mediada por RNA dupla fita, oferece bons resultados no controle de nematoides (MCCARTER, J. Molecular approaches toward resistance to plant parasitic nematodes. In: (Ed.). Plant Celi Monographs v.15, 2008. p.239-267.). Tal estratégia se baseia na transformação de plantas para a expressão de RNA dupla fita (dsRNA) compreendendo um fragmento da sequência específica de genes-alvos do fitonematoide. Genes alvo de interesse são genes essenciais ao fitonematoide ou genes envolvidos com o parasitismo, migração, formação ou manutenção do sítio de alimentação. Durante o ciclo dos nematoides, estes ingerem o conteúdo citoplasmático das células gigantes de raízes infectadas, provocando a absorção do dsRNA, o que pode resultar no silenciamento do gene correspondente. Conforme a função do gene silenciado, diversas disfunções podem ser geradas no fitonematoide pelo silenciamento e/ou redução da expressão de genes específicos, de forma que a infecção pode ser abortada.

Interferência mediada por RNA (RNAi) refere-se à redução específica da expressão do gene através da utilização de moléculas de RNA de sequência complementar. Este fenômeno, primeiramente relatado em *Caenorhabditis elegans* por GUO & KEMPHUES (GUO.S. & KEMPHUES, K.

J. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell*, v. 81, n. 4, p. 611-620, 1995) e subsequentemente demonstrado por FIRE *et al.* (FIRE, A.; XU.S.; MONTGOMERY.M. K.; KOSTAS.S. A.; DRIVER, S. E. & MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 391, n. 6669, p. 806-11, Feb 19 1998), que descobriram que a presença do RNA fita dupla (dsRNA), formado a partir do anelamento das fitas senso e antisenso presente nas preparações de RNA *in vitro*, é responsável pelo silenciamento gênico.

10 Posteriormente, BERNSTEIN *et al.* (BERNSTEIN, E.; CAUDY.A. A.; HAMMOND,S. M. & HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, v. 409, n. 6818, p. 363-6, Jan 18 2001), indicaram que a DICER ("dsRNA-specific RNase III-type endonuclease") uma enzima ribonuclease tipo III (RNase III) era responsável pelo
15 processamento do dsRNA em sequências de -21 nucleotídeos (nt). O complexo DCR2/R2D2 liga-se a essas pequenas moléculas de RNA interferente (siRNA) (LIU, Q.; RAND, T. A.; KALIDAS.S.; DU, F.; KIM, H. E.; SMITH, D. P. & WANG, X. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science*, v. 301, n. 5641, p. 1921-5, Sep 26
20 2003), o siRNA é incorporado em um complexo chamado RISC (RNA Induced Silencing Complex), que então determina a degradação de quaisquer moléculas de RNA que possuem sequência complementar (HAMMOND, S. M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D. & HANNON, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, v.
25 404, n. 6775, p. 293-6, Mar 16 2000). Este fenômeno de silenciamento do gene ocorre em vários organismos eucariotos, incluindo os nematoides e as plantas superiores (BERNSTEIN, E.; CAUDY.A. A.; HAMMOND, S. M. & HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, v. 409, n. 6818, p. 363-6, Jan 18 2001).

30 Pesquisadores têm sido capazes de adicionar RNA sintetizado *in vitro* diretamente nas células para se obter um silenciamento da expressão gênica. Por exemplo, KLINK & WOLNIAK (KLINK, V. P. & WOLNIAK, S. M.

Centrin is necessary for the formation of the motile apparatus in spermatids of *Marsilea*. *Mol Biol Celi*, v. 12, n. 3, p. 761-76, Mar 2001) foram capazes de silenciar o mRNA de centrina (centrin) usando dsRNA sintetizado *in vitro*, e para os efeitos de nocaute, eles demonstraram que o dsRNA é pelo menos dez vezes mais eficaz do que o RNA senso ou antisenso separadamente. Para alcançar o controle de nematoides parasitas de plantas usando a estratégia de silenciamento gênico, o mecanismo de RNAi é parcialmente executado pela planta e parcialmente pelo nematoide. Plantas expressam dsRNA de genes do nematoide, que são processados pela DICER e geram os siRNA. Quando os nematoides se alimentam dessas plantas, tanto dsRNA quanto siRNA são ingeridos.

Como ocorrido na planta, os nematoides digerem o dsRNA em siRNA usando seu complexo DICER. Os siRNA ingeridos, ou processados pelo próprio nematoide, ligam-se a RISC para induzir a degradação do mRNA específico no nematoide. Os siRNA são amplificados em nematoides pela RNA polimerase dependente de RNA (RDRP) (CHAPMAN, E. J. & CARRINGTON, J. C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics*, v. 8, n. 11, p. 884-96, Nov 2007; ZAMORE, P. D. & HALEY, B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*, v. 309, n. 5740, p. 1519-24, Sep 2 2005), onde o mRNA serve de molde para a síntese de mais dsRNA específico, elevando o efeito do silenciamento gênico.

Este silenciamento mediado por siRNA é altamente sequência-específica. Por exemplo, Tuschl e colaboradores demonstraram que mesmo uma incompatibilidade de uma única base, entre o siRNA e o mRNA alvo influencia o silenciamento gênico (ELBASHIR, S. M.; MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *The EMBO Journal*, v. 20, n. 23, p. 6877-88, Dec 3 2001). Apesar do silenciamento gênico ser altamente específico, é possível silenciar famílias de genes homólogos que compartilham sequências conservadas (MIKI, D.; ITOH, R. & SHIMAMOTO, K. RNA silencing of single and multi pie members in a

gene family of rice. *Plant physiology*, v. 138, n. 4, p. 1903-13, Aug 2005) ou com a construção quimérica de vários genes-aivo (ALLEN, R. S.; MILLGATE, A. G.; CH(TTY, J. A.; THISLETON, J.; MILLER, J. A.; FIST, A. J.; GERLACH, W. L. & LARKIN, P. J. RNAi-mediated replacement of morpl1ine with the nonnarcotic alkaloid reticuline in opium poppy. *Nature Biotechnology*, v. 22, n. 12, p. 1559-66, Dec 2004). Tem sido documentado que o efeito do RNAi, não é só difundido de célula para célula (FAGARD, M. & VAUCHERET, H. Systemic silencing signal(s). *Plant Molecular Biology*, v. 43, n. 2-3, p. 285-93, Jun 2000; KEHR, J. & BUHTZ, A. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of Experimental Botany*, v. 59, n. 1, p. 85-92, 2008), mas também em toda a planta (YOO, B. C.; KRAGLER, F.; VARKONYI-GASIC, E.; HAYWOOD, V.; ARCHER-EVANS, S.; LEE, Y. M.; LOUGH, T. J. & LUCAS, W. J. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, v. 16, n. 8, p. 1979-2000, Aug 2004).

Evidências indiretas indicam que o silenciamento de RNA move-se a longas distâncias através do floema e, no destino, espalha-se célula a célula através dos plasmodesmos em tecidos recipientes (JORGENSEN, R. A. RNA traffics information systemically in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 18, p. 11561-3, Sep 3 2002; MLOTSHWA, S.; VOINET, O.; METTE, M. F.; MATZKE, M.; VAUCHERET, H.; DING, S. W.; PRUSS, G. & VANCE, V. B. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell*, v. 14 Suppl, p. S289-301, 2002; VOINET, O.; VAIN, P.; ANGELL, S. & BAULCOMBE, D. C. Systemic Spread of Sequence-Specific Transgene RNA Degradation in Plants Is Initiated by Localized Introduction of Ectopic Promoterless DNA. *Cell*, v. 95, n. 2, p. 177-187, 1998), também HIMBER *et al* (HIMBER, C.; DUNOYER, P.; MOISSIARD, G.; RITZENTHALER, C. & VOINET, O. Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *The EMBO Journal*, v. 22, n. 17, p. 4523-33, Sep 1 2003) demonstraram que o efeito RNAi pode ocorrer tanto localmente quanto a longas distâncias. LIMPENS *et al* (LIMPENS, E.; RAMOS, J.; FRANKEN, C.; RAZ, V.; COMPAAN, B.; FRANSSEN, H.; BISSELING, T. & GEURTS, R. RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes* transformed

roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. Journal of experimental botany, v. 55, n. 399, p. 983-92, May 2004) também constatou que o sinal de silenciamento foi transportado sistematicamente a partir de raízes de *Arabidopsis thaliana* até a parte aérea, embora o grau de silenciamento tenha sido limitado e muito variável. Embora a transformação de nematoides parasitas de plantas represente uma abordagem para a implantação como estratégia de RNAi para controle de nematoides, não há relatos de sucesso com esta engenharia de nematoides, em parte pela sua natureza obrigatória de parasitismo. Além de inúmeros obstáculos regulatórios para liberar esse nematoide transgênico para o meio ambiente. Em *C. elegans*, RNAi tem sido utilizado transientemente para silenciar a expressão de quase todos os genes, induzindo diferentes efeitos fenotípicos incluindo letalidade (FRASER, A. G.; KAMATH, R. S.; ZIPPERLEN, P.; MARTINEZ-CAMPOS, M.; SOHRMANN, M. & AHRINGER, J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome 11 by systematic RNA interference. Nature, v. 408, n. 6810, p. 325-30, Nov 16 2000; GONCZY, P.; ECHEVERRI, C.; OEGEMA, K.; COULSON, A.; JONES, S. J.; COPLEY, R. R.; DUPERON, J.; OEGEMA, J.; BREHM, M.; CASSIN, E.; HANNAK, E.; KIRKHAM, M.; PICHLER, S.; FLOHRS, K.; GOESSENA; LEIDEL, S.; ALLEAUME, A. M.; MARTIN, C.; OZLU, N.; BORK, P. & HYMAN, A. A. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome 11. Nature, v. 408, n. 6810, p. 331-6, Nov 16 2000.; KAMATH, R. S.; FRASER, A. G.; DONG, Y.; POULIN, G.; DURBIN, R.; GOTTA, M.; KANAPIN, A.; LE BOT, N.; MORENO, S.; SOHRMANN, M.; WELCHMAN, D. P.; ZIPPERLEN, P. & AHRINGER, J. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. Nature, v. 421, n. 6920, p. 231-7, Jan 16 2003; MAEDA, I.; KOHARA, V.; YAMAMOTO, M. & SUGIMOTO, A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. Current biology: CB, v. 11, n. 3, p. 171-176, 2001). A interferência mediada por RNA pode ser realizada em *C. elegans* por ingestão de bactérias expressando dsRNA (TIMMONS, L. & FIRE, A. Specific interference by ingested dsRNA. Nature, v. 395, n. 6705, p. 854, Oct 29 1998), por absorção oral de dsRNA a

partir da solução (TABARA, H.; GRISHOK, A. & MELLO, C. C. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*, v. 282, n. 5388, p. 430-1, Oct 16 1998) Ou por microinjeção (MELLO, C. C. & CONTE, D., JR. Revealing the world of RNA interference. *Nature*, v. 431, n. 7006, p. 338-42, Sep 16 2004). Considerando os nematoides parasitas de plantas, o protocolo de ingestão de bactérias expressando dsRNA não é viável porque eles se alimentam apenas do conteúdo citoplasmático do sítio de alimentação. O protocolo inicialmente utilizado para administração de dsRNA para fitonematoides foi o da imersão de nematoides em solução de dsRNA para induzir ingestão e/ou absorção. Desde 2006, moléculas de dsRNA têm sido produzidas e oferecidas diretamente pela planta hospedeira geneticamente modificada.

Os nematoides formadores de galhas (NFGs) e nematoides formadores de cisto (NCs) são obrigatoriamente parasitas de raízes de plantas, tornando a oferta de dsRNA pelo hospedeiro uma estratégia ideal para silenciar genes de nematoides, bem como fornecer evidências diretas da função desses genes. Pesquisas anteriores, confirmam a viabilidade e efetividade do oferecimento de RNAi pelo hospedeiro para controle de nematoides. YADAV *et al.* (YADAV, B. C.; VELUTHAMBI, K. & SUBRAMANIAM, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, v. 148, n. 2, p. 219-22, Aug 2006) relataram que induziu RNAi utilizando dsRNAs de dois genes que codificam para integrase e fator de processamento de mRNA de *M. incógnita*, levando a proteção contra infecção por nematoides em plantas de fumo.

A expressão de dsRNA do gene de parasitismo 16D10 de NFG em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, resultou em resistência contra quatro das principais espécies desse gênero (HUANG, G.; ALLEN, R. S.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. & HUSSEY, R. S. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. n. 0027-8424 (Print), 20060927 DCOM-20061030 2006), enquanto (SINDHU, A. S.; MAIER, T. R.; MITCHUM, M. G.;

HUSSEY, R. S.; DAVIS, E. L. & BAUM, T. J. Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 1, p. 315-24, 2009) obtiveram reduções de 23% a 64%, em fêmeas de *H. schachtlii*, em linhagens transgênica de *Arabidopsis* expressando o dsRNA de quatro genes de parasitismo. RNA de interferência parece ser igualmente eficaz contra *H. glycines* em linhagens de soja transformadas. RYAN *et al.* (RYAN.M. S.; TIM, C. T.; JULIANE.S. E. & HAROLD.N. T. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm1 protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. *Functional Plant Biology*, v. 33, n. 11, p. 991-991, 2006) produziram com sucesso linhagens transgênicas de soja, usando a estratégia de RNAi específico de uma proteína principal do espermatozoário de *H. glycines*. Dados do bioensaio indicaram plantas transgênicas com redução em até 68% de ovos/g de tecido da raiz.

Os efeitos das moléculas de dsRNA expresso pela planta, se mostraram contínuos, aparecendo nas próximas gerações. KLINK *et al.* (KLINK, V. P.; KIM, K. H.; MARTINS.V.; MACDONALD.M. H.; BEARD, H. S.; ALKHAROUF.N. W.; LEE, S. K.; PARK, S. C.& MATTHEWS, B. F. A correlation between host-mediated expression of parasite genes as tandem inverted repeats and abrogation of development of female *Heterodera glycines* cyst formation during infection of *Glycine max*. *Planta*, v. 230, n. 1, p. 53-71, Jun 2009) inibiram efetivamente a formação de cistos de *H. glycines* usando uma construção com repetições invertidas de vários genes. Recentemente, LI *et al.* (LI, J.; TODD, T. C ; OAKLEV.T. R.; LEE, J.& TRICK, H. N. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe. *Planta*, v. 232, n. 3, p. 775-85, Aug 2010a); LI *et al.* (LI, J.; TODD, T. C. & TRICK, H. N. Rapid in planta evaluation of root expressed transgenes in chimeric soybean plants. *Plant Cell Reports*, v. 29, n. 2, p. 113-23, Feb 2010b) suprimiram com sucesso a reprodução de *H. glycines* em plantas de soja por RNAi para três diferentes genes de *H. glycines*.

Evidências moleculares diretas de oferecimento de RNAi pelo

hospedeiro regulam para baixo a expressão de genes-alvo de nematoides, observado por análise de PCR em tempo real (RT-qPCR) de nematoides que se alimentaram de raízes transgênicas (LI, J.;TODD, T. C ; OAKLEV.T. R.; LEE, J.& TRICK, H. N. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe. Planta, v. 232, n. 3, p. 775-85, Aug 2010a; SINDHU, A. S.; MAIER, T. R.; MITCHUM, M. G.; HUSSEY, R. S.; DAVIS, E. L & BAUM, T. J. Effective and specific in planta RNAi in cyst nematodes: expression interference of four parasitism genes reduces parasitic success. Journal of Experimental Botany, v. 60, n. 1, p. 315-24, 2009). Plantas transgênicas expressando dsRNAs de genes de nematoides têm demonstrado maior sucesso em NFGs do que em NCs. Uma provável razão pode ser a facilidade de ingestão de moléculas em NFGs devido ao seu maior limite de exclusão por tamanho do que em NCs.

Construções de RNA capazes de formar dsRNA para a inibição de genes de nematoides por meio de RNA de interferência e consequente indução de resistência a tais pragas na planta, bem como construções de DNA capazes de expressar tais construções de RNA na planta estão disponíveis (EP2330203).

WO201 10601 51 ensina vetores compreendendo construções para a indução de resistência a nematoides, dentre eles *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*, codificando fitas de RNA dupla-fita que inibem a expressão de um gene da peste alvo.

WO2006045591 ensina, dentre outros, métodos para a produção de plantas transgênicas resistentes a nematoides compreendendo a co-expressão na planta de moléculas de RNA dupla-fita tendo como alvo genes de diferentes espécies, dentre elas *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*. WO2006045591 ensina ainda que a transferência de dsRNA para a peste pode ser melhorada através do uso de promotores tecido-específicos para as partes mais acessíveis à peste, como, dentre outros, promotores específicos de raiz ou promotores induzidos por nematoides.

O silenciamento do gene do fator de splicing Prp-17 de *Heterodera glycines* através da expressão de siRNAs em soja transgênica foi eficaz

na indução de resistência à peste (Li, J.; Todd, T. C ; Oaklev, T. R.; Lee, J.& Trick, H. N. Host-derived suppression of nematode reproductive and fitness genes decreases fecundity of *Heterodera glycines* Ichinohe. *Planta*, v. 232, n. 3, p. 775-85, Aug 2010).

5 A expressão de dsRNA do fator de splicing (FS) de *M. incógnita* obteve uma redução de 90% de nematoides (*M. incógnita*) estabelecidos nas raízes (Yadav, B.C.; Veluthambi, K. & Subramaniam, K. Host-generated double stranded RNA induces RNAi in plant-parasitic nematodes and protects the host from infection. *Molecular and Biochemistry Parasitology*, v. 10 148, n. 2, p. 219-22, Aug 2006).

A expressão de dsRNA de um gene relacionado ao FS de *H. glycines* reduziu o número de fêmeas colonizando as raízes a menos de 20%. (Klink, V. P. & Matthews, B. F. Emerging Approaches to Broaden Resistance of Soybean to Soybean Cyst Nematode as Supported by Gene Expression Studies. *Plant Physiol.* 2009 November; 151(3): 1017-1022).

PI0701 172-5 descreve um promotor constitutivo de soja, o promotor do gene da proteína de conjugação a ubiquitina de soja (UceS 8.3).

O promotor UceS8.3 é induzido pela invasão de raízes por *M. incógnita* (Miranda, V. J. Caracterização da expressão do gene codificador da enzima de conjugação a ubiquitina (E2) em soja inoculada com *Meloidogyne incógnita* e infestada com *Anticarsia gemmatilis*. 201 1. *Magister Science*. Biologia Celular, Universidade de Brasília).

No entanto, há no campo da promoção de resistência contra nematoides via RNA de interferência a necessidade de construções capazes de expressar moléculas de dsRNA que silenciem genes de nematoides apenas em tecidos alvo de infestação por nematoides.

As construções para expressão de RNA de interferência já conhecidas, utilizam promotores constitutivos, geralmente isolados de vírus, como o CaMV 35S para uma expressão constitutiva do dsRNA.

30 Há, portanto, a necessidade de construções eficientes no silenciamento de genes de nematoides para a indução de resistência a nematoides em culturas capazes de expressar as moléculas de dsRNA sob controle

de um promotor específico de planta.

A presente invenção tem como diferencial ser um vetor de expressão de dsRNA específico para genes-alvo de mais de uma espécie de nematoide e por ser regulada por um promotor de soja induzido por nematoides. A construção contendo o gene-alvo está sob controle de um promotor de soja, isolado, caracterizado e patenteado pelo nosso grupo, e que possui forte expressão na raiz da planta (Grossi-de-Sa et al.,2010), especialmente quando essas estão parasitadas por *M. incógnita* (Miranda et al., 2013), especificamente nos sítio de alimentação.

Inicialmente o promotor UceS8.3 foi isolado de plantas de soja por TAIL-PCR com oligonucleotídeos desenhados para o gene do fator 2 de conjugação a ubiquitina (GmE2). Posteriormente esse promotor foi utilizado em transformação genética de planta modelo *Arabidopsis thaliana* para sua caracterização funcional devido à expressão do gene repórter GUS, demonstrando expressão em todos os tecidos de planta, especialmente em raízes (Grossi-de-Sa et al.,2010). PCR em tempo real de raízes de soja inoculadas com *M. incógnita* em 7, 14, 21 e 28 DAI demonstram aumento de expressão transcricional de 2-6 vezes do gene GmE2, regulado pelo promotor UceS8.3 (Miranda et al., 2013). Hibridização *in situ* demonstrou a localização da expressão relacionada à UceS8.3 em células gigantes e adjacentes ao sítio de alimentação nas galhas.

Sumário da Invenção

A presente invenção compreende cassetes de expressão em plantas capazes de silenciar genes de múltiplas espécies de nematoides que se alimentam das referidas plantas conferindo resistência às referidas espécies de nematoides. Mais especificamente, os cassetes de expressão da presente invenção são capazes de expressar as moléculas de dsRNA em tecidos alvo de infestação por nematoides.

A presente invenção fornece ainda vetores compreendendo o referido cassete de expressão, métodos para produção de uma planta resistente a múltiplas espécies de nematoides bem como para o controle de nematoides em uma plantação, plantas resistentes a múltiplas espécies de

nematoides, suas sementes e produtos produzidos a partir de material extraído das referidas plantas.

Descrição das Figuras

Figura 1: Esquema representativo da construção gênica utilizada para transformação de soja visando resistência a *Meloidogyne incógnita* e *Heterodera glycines*. A seta preta indica a posição do promotor do fator de conjugação a ubiquitina de soja UceS8.3, isolado e caracterizado no LIMPP e protegido pela Embrapa por patenteamento. A construção gênica inclui sequências do gene-alvo fator de splicing de *M. incógnita* e *H. glycines* somando 440 pb em duas posições palindrômicas, ou seja, reverso e complementar, a fim de permitir a formação do RNA dupla fita. Tal região palindrômica está separada pela região intrônica oriunda do vetor de RNAi, pKannibal, originalmente isolado de *Arabidopsis thaliana*. tNOS é o terminador de transcrição utilizado. As setas vermelhas e verdes indicam as posições de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para diagnóstico de transformação de soja (Figura 2A). A sequência dos oligonucleotídeos está na Tabela 1.

Figura 2: **(A)** Diagnóstico de transformação de soja por PCR. A imagem acima foi obtida por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo do produto de PCR com os oligonucleotídeos GmFSMiHg-F e GmFSMiHg-R (descritos na Tabela 1 e Figura 1). O DNA de folhas foi isolado e depois utilizado na PCR. A numeração corresponde aos indivíduos de terceira geração (T3), obtidos da multiplicação sucessiva do evento de transformação 4I T0. CN: controle negativo sem DNA molde. CP: controle positivo, DNA molde do vetor UceS8.3::GmFSMiHg. **(B)** Acclimação de plantas de soja geneticamente modificada. Após a transformação por biobalística as plântulas foram mantidas em magentas por 15 dias sob seleção com o herbicida imidazolinona. Após crescimento, as plantas foram transferidas para copos com substrato orgânico e argila e foram mantidas cobertas com saco plástico para manter a umidade por uma semana. Posteriormente, as plantas foram transferidas para sacos plásticos de 20 L com o mesmo substrato e mantidas até completarem o ciclo de vida. Sementes T1 oriundas

de TO, foram multiplicadas em casa de vegetação até a T2.

Figura 3: Bioensaio nematológico. As plantas T3 foram desafiadas com *M. incógnita* para determinação de indução de resistência a nematoides. (A) gráfico do resultado do desafio de eventos de soja GM (4A, 4B, 4C, 4E, 4G e 4I) e de planta controle não transformada (BR-16). A reta superior denota o número de plantas individualmente testadas no experimento de resistência (n) e o percentual de redução de ovos obtidos (%). A reta acima das barras denota erro padrão do experimento. A letra acima da barra demonstra diferença estatisticamente significativa; (B) gráfico com detalhamento do bioensaio, sem a barra com contagem da planta controle e com escala apropriada. A análise estatística nesse caso não levou em conta a planta controle.

Descrição Detalhada da Invenção

Uma concretização da presente invenção é um cassete de expressão compreendendo:

- (i) um promotor funcional em planta, induzido por nematoides;
- (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
- (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
- (iii) uma sequência separadora;
- (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 5;
- (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 6;
- (vi) um terminador funcional em planta.

O referido cassete é capaz de expressar dsRNA em plantas compreendendo fragmentos de genes de nematoides que silenciam genes conservados dos referidos nematoides através do mecanismo conhecido como RNA de interferência (RNAi).

Em uma concretização preferida da presente invenção, as sequências sense e anti-sense estão separadas por uma sequência separadora. Opcionalmente, da região separadora é um íntron. Um "íntron" é uma sequência de nucleotídeo que é transcrita e está presente no pré mRNA, mas

é removida através de clivagem e a re-ligação do mRNA dentro da célula gerando um mRNA maduro que pode ser traduzido em uma proteína. Exemplos de íntrons incluem, mas não são limitados a, íntron pdk, íntron catalase da mamona, íntron Delta 12 desnaturase de algodão, Delta 12 desnaturase de Arabidopsis, íntron ubiquitina de milho, íntron de SV40, íntrons do gene da malato sintase. Preferencialmente a seqüência separadora da presente invenção é um íntron PDK.

"Promotor" refere-se à seqüência de DNA em um gene, usualmente localizada a montante da seqüência codificadora, a qual controla a expressão da seqüência codificadora promovendo o reconhecimento pela RNA polimerase e outros fatores requeridos para a própria transcrição. Em uma construção de DNA artificial, promotores podem também ser utilizados para transcrever dsRNA. Promotores podem também conter seqüências de DNA que estão envolvidas na ligação de fatores de proteínas as quais controlam o efeito do início da transcrição em resposta a condições fisiológicas ou de desenvolvimento.

Em um dos aspectos da invenção, o promotor é um promotor constitutivo. Em outro aspecto da invenção, a atividade do promotor é estimulada por fatores externos ou internos tais como, mas não limitado a, hormônios, compostos químicos, impulsos mecânicos, e condições de estresse biótico ou abiótico. A atividade do promotor também pode ser regulada de maneira temporal e espacial (como por exemplo, promotores tecido-específicos e promotores regulados durante o desenvolvimento).

O promotor pode conter elementos "enhancers". Um "enhancer" é uma seqüência de DNA que pode estimular a atividade do promotor. Ela pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível e/ou a tecido-especificidade de um promotor. "Promotores constitutivos" referem-se àqueles que dirigem a expressão gênica em todos os tecidos e durante todo tempo. Promotores "tecido-específicos" ou "desenvolvimento-específicos" são aqueles que dirigem a expressão gênica quase que exclusivamente em tecidos específicos, tais como folhas, raízes, caules, flores, frutos ou sementes, ou em estágios do

desenvolvimento específicos em um tecido, como no início ou final da embriogênese. O termo "expressão" refere-se a transcrição e acumulação estável do dsRNA derivado dos fragmentos de ácidos nucléicos da invenção que, em conjunto com a aparelhagem de produção de proteína da célula, resulta em níveis alterados de mio-inositol 1-fosfato sintase. "Inibição por interferência" refere-se a produção de transcritos de dsRNA capazes de prevenir a expressão da proteína alvo.

Em uma concretização preferida da presente invenção, o referido promotor é específico de tecidos colonizados por nematoides ou induzido por infestação por nematoides. Preferencialmente o promotor tem a sequência identificada como SEQ ID NO: 1.

Ainda de acordo com uma concretização preferida da presente invenção, as sequências sense e anti-sense de (ii) e (iv) pertencem a um gene que codifica um fator de splicing (FS) do nematoide.

Em uma concretização preferida da presente invenção as sequências dos componentes (ii) e (iv) pertencem às espécies de nematoides *Heterodera glycines* e *Meloidogyne incógnita*, respectivamente, e mais preferivelmente o cassete de expressão contém a seguinte composição:

(a) uma sequência promotora tendo uma sequência substancialmente similar à SEQ ID NO: 1

(b) a primeira sequência sense tendo uma sequência substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;

(b) a segunda sequência sense promotora tendo uma sequência substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;

(c) a sequência separadora promotora tendo uma sequência substancialmente similar à SEQ ID NO: 4;

(d) a primeira sequência anti-sense promotora tendo uma sequência substancialmente similar à SEQ ID NO: 5;

(e) a segunda sequência anti-sense promotora tendo uma sequência substancialmente similar à SEQ ID NO: 6;

(f) a sequência terminadora promotora tendo uma sequência substancialmente similar à SEQ ID NO: 7.

Em uma concretização preferida da presente invenção, a sequência do cassete de expressão é substancialmente similar à SEQ ID NO: 8.

O termo "substancialmente similar" ou "similaridade substancial" refere-se a fragmentos de ácidos nucleicos nos quais mudanças em uma ou mais bases de nucleotídeos não afetam a habilidade do fragmento de ácido nucleico mediar a alteração da expressão gênica pelo silenciamento gênico através, por exemplo, da tecnologia antisense, co-supressão ou RNA de interferência (RNAi). Fragmentos de ácido nucleico substancialmente similares da presente invenção podem ser caracterizados também pela porcentagem de similaridade de suas sequências de nucleotídeos com as sequências de nucleotídeo dos fragmentos de ácidos nucleicos descritas aqui (SEQ ID NO 1-8), como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucleicos preferidos são aqueles cujas sequências de nucleotídeos têm pelo menos cerca de 40 ou 45% de identidade de sequência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 80% ou 85% de identidade de sequência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a sequência de referência. O alinhamento de sequência e o cálculo de porcentagem de similaridade da presente invenção foram realizados utilizando-se o Programa DNAMAN for windows (Lynnon Corporation, 2001), utilizando sequências depositadas no GenBank, através da integração do Web browser.

Uma das formas de se formar o dsRNA é estando presente na molécula de DNA a sequência de nucleotídeos do gene alvo na orientação sense, e uma sequência de nucleotídeos na orientação antisense, podendo haver ou não uma região espaçadora entre as sequências de nucleotídeos sense e antisense. As sequências de nucleotídeos mencionadas podem ser constituídas de cerca de 19nt a 2000nt ou ainda cerca de 5000 nucleotídeos

ou mais, cada um tendo uma similaridade substancial de sequência total com cerca de 40% a 100%. Quanto mais longa for a sequência, menos estringência é requerida para similaridade substancial total da sequência. Os fragmentos contendo pelo menos cerca de 19 nucleotídeos devem ter preferencialmente cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a sequência de referência, com possibilidade de ter cerca de 2 nucleotídeos distintos não contíguos. Preferencialmente são utilizados fragmentos acima de 60pb, mais preferencialmente ainda fragmentos entre 100 a 500pb.

Em um dos aspectos da invenção, a molécula de dsRNA pode compreender uma ou mais regiões tendo uma similaridade substancial de sequência para as regiões com pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos dos nucleotídeos sense do gene alvo, definida como primeira região e, uma ou mais regiões tendo uma similaridade substancial de sequência para as regiões com cerca de 19 nucleotídeos consecutivos do complemento dos nucleotídeos sense do gene alvo, definida como segunda região, onde essas regiões podem ter pares de bases separando-as uma da outra.

A invenção compreende ainda vetores compreendendo os cassetes da presente invenção assim como métodos para produção de uma planta resistente a múltiplas espécies de nematoides, compreendendo inserir em uma célula vegetal um cassete da presente invenção e regenerar uma planta a partir da referida célula vegetal.

A invenção compreende ainda plantas resistentes a múltiplas espécies de nematoides possuindo um cassete da presente invenção integrado ao seu genoma.

"Plantas" referem-se a organismos fotossintéticos, ambos eucariotos e procariotos, onde o termo "plantas desenvolvidas" refere-se a plantas eucariotas. Os ácidos nucleicos da invenção podem ser utilizados para conferir tratos desejados em essencialmente qualquer planta. Então, a invenção possui uso sobre várias espécies de plantas, incluindo espécies dos géneros Anacardium, Anona, Arachis, Artocarpus, Asparagus, Atropa, Avena, Brassica, Carica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Carthamus, Cocos, Coffea,

Cucumis, Cucurbita, Daucus, Elaeis, Fragaria, Glycine, Gossypium, Helianthus, Heterocallis, Hordeum, Hyoseyamus, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Malus, Manihot, Majorana, Medicago, Nicotiana, Olea, Oryza, Panieum, Pannasetum, Passiflora, Persea, Phaseolus, Pistachia, Pisum, 5 Pyrus, Prunus, Psidium, Raphanus, Ricinus, Secale, Senecio, Sinapis, Solanum, Sorghum, Theobromus, Trigonella, Triticum, Vicia, Vitis, Vigna, e Zea. Preferivelmente a planta da presente invenção é uma planta de soja.

A invenção compreende ainda sementes de uma planta possuindo um cassete da presente invenção integrado ao seu genoma bem como 10 produtos produzidos a partir de material extraído de uma planta possuindo um cassete da presente invenção integrado ao seu genoma, tais como produtos alimentícios e/ou ração animal.

A invenção compreende também métodos para o controle de nematoides em uma plantação, compreendendo cultivar uma planta possuindo um cassete da presente invenção integrado ao seu genoma. 15

EXEMPLOS

A presente invenção é ainda definida nos seguintes Exemplos. Deve ser entendido que esses Exemplos, enquanto indicam parte da invenção, são colocados como forma de ilustração somente, não tendo, portanto, 20 qualquer cunho limitante do escopo das presentes invenções.

Técnicas usuais de biologia molecular tais como transformação de bactérias e eletroforese em gel de agarose de ácidos nucleicos são referidos através de termos comuns para descrevê-los. Detalhes da prática dessas técnicas, bem conhecidos no estado da técnica, são descritos em Sambrook, et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). Várias soluções utilizadas nas manipulações experimentais são referidas por seus nomes comuns tais como "solução de lise", "SSC", "SDS", etc. As composições dessas soluções podem ser encontradas na referência Sambrook, et al. (supracitada). 25

30 Exemplo 1 - Seleção dos genes

Novos genes-alvo para RNAi são selecionados com base nos seguintes critérios: (a) seus ortólogos em *C. elegans* devem ser genes es-

senciais e/ou possuir fenótipos letais quando silenciados ou nocauteados; (b) suas sequências devem apresentar alta identidade apenas com espécies de nematoides; (c) suas sequências devem estar disponíveis no banco de dados (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) e (d) Para assegurar
5 que os propostos dsRNAs não sejam um risco a organismos não-alvo, as sequências dos fragmentos dos genes em questão utilizados para a síntese de dsRNA são comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST"n(versão 2.2.15) (ALTSCHUL, S. F.; GISH.W.; MILLER.W.; MYERS.E. W. & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool.
10 Journal of Molecular Biology, v. 215, n. 3, p. 403-10, Oct 5 1990).

Baseado nas revisões de literatura, bem como sequências disponíveis no banco de dados (GenBank,) foi selecionado um gene de processamento de mRNA (FS) em *M. incógnita* (AW828516) e um gene também envolvido no processamento de mRNA (FS) em *H. glycines* (AF1 13915).

15 Exemplo 2 - Seleção das sequências complementares aos mRNAs dos genes de processamento de mRNA em *M. incógnita* e *H. glycines*

Uma vez selecionados os genes-alvo, suas sequências foram submetidas ao Block™ RNAi Designer (<http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnai-express/>), para a escolha da região de cada gene com maior probabilidade de
20 produção de siRNAs eficientes. Foram escolhidas regiões contendo entre 120 e 250 pares de base.

As regiões gênicas selecionadas no Block™ RNAi Designer foram submetidas ao banco de dados GenBank™ pelos programas BLASTn (nucleotide blast) e BLASTp (protein blast, no endereço eletrônico do NCBI
25 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/biast/Blast.cgi>)).afim de identificar possíveis efeitos de RNAi em plantas, hmlalOs e outros organismos não-alvo.

Exemplo 3 - Oligonucleotídeos para análise de expressão e de silenciamento gênico

Para avaliar a eficiência do silenciamento gênico após ensaios
30 de infestação em linhagens de soja GM, foram desenhados pares de oligonucleotídeos (primers) para cada gene.

O desenho dos oligonucleotídeos foi realizado pelo programa

primer3 v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mitt.edu/>), que sugere os melhores pares dentro da sequência fornecida e para o tamanho do produto desejado. O programa também fornece parâmetros importantes como T_m (melting temperature), %GC, formação de loop e de homodímero.

5 Os oligos escolhidos estão descritos na Tabela 1

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos

Nome	Identificação
InGmFSMiHg-F	5'-CACAATGACATGATCTATC-3' (SEQ ID NO: 9)
InGmFSMiHg-R	5'-CAAAGCGCAAGATCTATC-3' (SEQ ID NO: 10)
GmFSMiHg-F	5'-ACACCCAACGTGATTGAA-3' (SEQ ID NO: 11)
GmFSMiHg-R	5'-AAAATTAATTCATGAGG-3' (SEQ ID NO: 12)

Exemplo 4 - Obtenção das plantas transgênicas por biobalística

Os disparos de partículas de tungstênio com DNA adsorvido foram efetuados na região mehstemática de embriões provenientes de sementes da cultivar de soja BR-16. Foi utilizada a estratégia de co-transformação com os plasmídios UceSB.3::GmFSMiHg (para silenciamento gênico de fito-nematoides) e pAC321 (resistência a herbicida), utilizando o protocolo de biobalística (RECH, E. L ; VIANNA.G. R.& ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. Nature Protocols, v. 3, n. 3, p. 410-418, 2008.

As sementes foram primeiramente esterilizadas em etanol 70% por 10 minutos, seguida por imersão em hipoclorito 50% por vinte minutos, e então lavadas três vezes com água destilada autoclavada em câmara de fluxo laminar, permanecendo imersas em água destilada por um período aproximadamente de 16 horas.

As sementes foram então incisadas para a retirada dos embriões com o auxílio de pinças e bisturis estéreis, sendo armazenadas em placa de Petri com água destilada para evitar a dessecação. Em seguida, os primórdios foliares foram retirados com o auxílio de lupa, para exposição da região do meristema apical.

Posteriormente, os embriões foram secos sob exposição ao ambiente em papel filtro em câmara de fluxo laminar, e posteriormente posicio-

nados em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, contendo 11 mL de meio MS (Murashige & Skoog 1962), 3% de sacarose e 0,8% de phytigel e pH 5,7. Dispostos na linha de um círculo de 16 mm de diâmetro centralizado a placa (zona de morte), tendo a região do meristema apical direcionada para cima.

5 As construções de DNA foram precipitadas sobre micropartículas de tungstênio como auxílio de CaCl₂e espermidina. A introdução das construções gênicas de interesse ocorreu pelo uso do acelerador de partículas desenvolvido no Brasil.

10 Após a co-transformação com os genes de interesse, os embriões foram transferido para placas contendo meio MS suplementado com benzilaminopurina (BAP - 5 mg/ml), 3% de sacarose, 0,6% de ágar e pH 5,7, onde permaneceram aproximadamente 18 horas ao abrigo da luz a 28° C para indução ao multibrotamento. Os embriões foram então transferidos para magentas contendo meio seletivo com, MS,3% de sacarose, 0,15 µM de herbicida Imazapyr, 0,8% de ágar e, vitamina B5, pH 5,7, sendo 9 embriões em cada
15 magenta, os quais foram mantidos em câmara de crescimento a temperatura de 28° C, com 16 horas de fotoperíodo e luminosidade 350 µmols.m⁻².s⁻¹e umidade relativa acima de 80% por aproximadamente 45 dias.

20 Após esse período foram transferidos dois embriões multibrotados por copo contendo areia:vermiculita (1:1) autoclavadas e umedecidas com solução nutritiva e cobertos com saco plástico para aclimação. Os embriões multibrotados foram irrigados com solução nutritiva a cada 7 dias e mantidos por mais 28 dias em câmara climatizada, até a transferência para a casa de vegetação.

25 Após esse período de 28 dias, foram transferidos para casa de vegetação em vasos contendo uma mistura de terra e areia esterilizada (5:3), cobertos com saco plástico durante sete dias para aclimação, sendo substituído por saco plástico furado por mais cinco dias. Após esse período de aclimação os sacos plásticos foram retirados para o desenvolvimento
30 normal das plantas até o início das análises moleculares para a identificação de plantas positivas pela técnica de PCR.

No período de 3 meses foram transformados 2946 embriões por

biobalística, que foram selecionados por resistência ao herbicida Imazapir, cuja resistência é conferida pelo gene Ahas. Os 1495 embriões remanescentes foram aclimatados e transferidos para a casa de vegetação. Desses anteriores, 673 foram capazes de se regenerarem e se desenvolverem. Des-

5 ses, 350 plantas foram testadas por PCR resultando em 31 plantas (8,85% do total analisado) que amplificaram o transgene (Tabela 2). Considerando todas as etapas realizadas, foi obtido quase 1% de plantas GM PCR-positivo em relação ao número de embriões transformados.

Os resultados foram confirmados por diferentes ampliações por PCR utilizando pares de primers específicos (Figura 1) para construção UceS8.3::GmFSMiHg.

Foram realizadas 3150 ampliações, partindo de 1050 amostras de DNA, para caracterização das 350 plantas regeneradas (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados obtidos pelo processo de transformação

Data de Transformação	Co-transformação	No. de embriões usados para transformação	No. De plantas transferidas para areia :vermiculita	No. of plantas transferidas para casa de vegetação	No. de plantas testadas por PCR	No. de plantas positivas confirmadas por PCR
24/05/2010	Ahas/FSMiHg	260	103	48	34	2
09/06/2010	Ahas/FSMiHg	260	130	35	23	2
14/06/2010	Ahas/FSMiHg	180	80	41	34	3
21/06/2010	Ahas/FSMiHg	120	39	51	7	2
28/06/2010	Ahas/FSMiHg	180	133	34	19	2
30/06/2010	Ahas/FSMiHg	180	119	49	27	2
05/07/2010	Ahas/FSMiHg	180	44	21	13	1
07/07/2010	Ahas/FSMiHg	180	114	69	36	4
12/07/2010	Ahas/FSMiHg	180	69	60	17	2
14/07/2010	Ahas/FSMiHg	280	128	53	20	1
19/07/2010	Ahas/FSMiHg	278	271	96	65	6
21/07/2010	Ahas/FSMiHg	161	151	39	16	1
26/07/2010	Ahas/FSMiHg	235	40	50	28	2
04/08/2010	Ahas/FSMiHg	272	74	27	11	1
Total	-	2946	1495	673	350	31
Taxa sobrevivência	-	-	51%	23%	12%	1%

15 Taxa de sobrevivência: Taxa sempre em relação ao número inicial de embriões bombardeados

Exemplo 5 - Análises de PCR

A seleção das plantas transformadas foi feita por análises de PCR. Usando o kit Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, Saint

Louis, MO, EUA), o DNA de folhas foi purificado e a PCR amplificou fragmentos dos transgenes no genoma de cada evento gerado. Cada planta teve seu DNA extraído independentemente três vezes, cada qual partindo de diferentes trifólios, sendo que cada amostra de DNA serviu de molde para três PCR-positivas também independentes. Foram consideradas como plantas PCR-positivas aquelas que amplificaram o transgene ao menos uma vez para cada extração de DNA, ou seja, para cada trifólio. A confirmação da inserção da construção UceS8.3::GnIFSMiHg foi feita separadamente com dois pares de primers que amplificam diferentes regiões dentro da construção. Os primers InGmFSMiHg-F e InGmFSMiHg-R (SEQ ID NO 9 e SEQ ID NO 10 - Figura 1) amplificam um fragmento de 135 pb, no intron. Já os primers GmFSMiHg-F e GmFSMiHg-R (SEQ ID NO 11 e SEQ ID NO 12 - Figura 1) amplificam um fragmento de 440 pb na região senso. Utilizando 400 nM de cada primer, as amplificações por PCR foram realizadas em termociclador Mycycler (BioRad), com o programa: desnaturação inicial de 1'30" a 94° C, 35 ciclos de desnaturação de 30" a 94° C, anelamento de 30" a 55° C e extensão de 45" a 72° C, seguido de uma extensão final de 5' a 72° C. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,3%, corados com brometo de etídeo e visualizados em transluminador.

Plantas PCR-positivas para os dois amplicons foram transferidas para vasos de 15L com solo e mantidas em casa de vegetação.

Exemplo 6 - Bioensaio dos eventos transformados com a construção UceS8.3::GmFSMiHg contra *M. incógnita*

Para averiguar o efeito do silenciamento do gene de processamento do mRNA (FS) nos nematoides foram realizados bioensaios com inoculação de J2 de *M. incógnita* nas plantas transformadas com a construção a ser estudada.

Cultura de *M. incógnita*

A cultura de *M. incógnita*, raça 1, foi mantida em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*), da variedade suscetível Santa Cruz e cultivar Kada Gigante. A coleta de nematoides em seus diferentes estádios de desenvolvimento foi realizada a partir de 28 dias após a inoculação (DAI).

Extração de ovos

Os ovos foram extraídos de acordo com HUSSEY & BARKER 1973 (HUSSEY, R. S. & BARKER, A. A. Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. The Plant Disease Repórter v. 57, p. 1025-1028, 1973). Brevemente, as raízes foram trituradas em liquidificador por dois minutos, em hipoclorito de sódio (NaOCl)0,5%. A contagem dos ovos foi feita em lâmina de Peters, utilizando microscópio óptico de luz (VRAIN, T. C A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. Journal Nematology, v. 9, p. 249-251, 1977.).

Extração de J2 pré-parasíticos

Para a coleta de juvenis em estágio J2, a suspensão de ovos foi submetida à técnica do funil de Baernlann, mantidas a temperatura ambiente, em um recipiente contendo água destilada para permitir a eclosão dos ovos e subsequentemente coleta dos nematoides. A coleta de J2 eclodidos foi realizada ao longo de uma semana, a cada dois dias.

Bioensaio

A fim de avaliar a indução de resistência a *M.incógnita* nos eventos de soja GM foi montado um bioensaio em casa de vegetação. Progénies da segunda geração (T3), no estágio de 2-3 trifólios, foram plantadas em vasos que continham 300 mL de solo, que foram inoculados com uma população aproximadamente 1.000 J2 de *M.incógnita* 1. Plantas da cultivar BR-16 (não transgênica), que não possui resistência a *M.incógnita* raça 1, foram plantadas e inoculadas servindo como controle. As plantas permaneceram em casa de vegetação durante 6 semanas, sendo irrigadas quando necessário. As raízes de soja foram processadas individualmente para a extração dos ovos aos 45 dias após inoculação (DAI). As raízes foram individualmente lavadas para retirada de solo, secas com papel toalha, pesadas, trituradas em liquidificador com 0,5% NaClO por 2 minutos, lavadas com jato d'água e os ovos foram separados em peneira de 500 Mesh.

Considerando cada planta, o volume final da suspensão com ovos obtidos foi corrigido para 30 mL, sendo que três alíquotas de 1mL fo-

ram retiradas. Após contagem de ovos usando microscópio e lâmina de Peters, a contagem foi normalizada com a massa da raiz, determinando o número de ovos g-l de raiz.

5 Todos os dados obtidos do bioensaio foram avaliados estatisticamente por meio do procedimento de modelos lineares generalizados (GLM) utilizando pacotes estatísticos do Programa R (R: A language and environment for statistical computing. 2005. Disponível em: <http://www.R-project.org>).

10 As sementes dos eventos transformados foram germinadas e as plantas que se desenvolveram foram transplantadas para vasos em casa de vegetação. Quando atingiram o estágio de 2-3 trifólios, as plantas foram genotipadas por PCR para a detecção do transgene (Figura 2A). As plantas que não apresentaram o fragmento correspondente foram descartadas, sendo que apenas as plantas positivas foram utilizadas nos bioensaios (Figura 15 2B).

Cada planta foi inoculada com aproximadamente 1000 J2 obtidos em sistema de eclosão. Cada tratamento foi composto de 6 a 10 repetições. O desafio foi completamente repetido duas vezes em períodos diferentes. Aproximadamente seis semanas após a inoculação, as raízes das plantas foram individualmente extraídas e processadas para determinação do número de ovos. g-l de raiz. Todos os valores dos bioensaios foram relativos em relação ao tratamento controle para normalizar os dados entre as repetições biológicas, e possibilitar a análise estatística. Esta normalização foi necessária porque os dados referentes à infecção de fitonematoides variam muito de um experimento para outro, podendo causar erro de interpretação destes dados. Estas variações são inerentes tanto do experimento com nematoides, pois não se sabe quantos realmente penetram na raiz, como da técnica de RNAi, pois não se sabe o quanto o nematoide vai ingerir de dsRNA/siRNA. Para a avaliação estatística de todos os dados, foi utilizada a análise de modelos lineares generalizados (GLM), e após a definição do melhor modelo de ajuste para cada grupo de dados (por exemplo: número de ovos, número de J2 eclodidos, etc.) foi realizada uma análise de variância 30

dos desvios (ANODEV) (Pacote "car", programa R.). Nos casos em que a ANODEV foi significativa, os tratamentos foram submetidos à análise de contrastes (Pacote "contrast", programa R) para determinar se existem diferenças significativas entre os tratamentos.

5 Ao avaliar os dados referentes aos eventos de soja com a construção UceS8.3::GmFSMiHg, o número ovos por grama de raiz se ajustou melhor ao modelo de distribuição normal com função de ligação identidade. Ao comparar-se o número de ovos g-l de raiz entre o tratamento controle e os eventos transgênicos expressando dsRNA para FS, foi verificado que este número foi de 71% a 91% menor nos eventos transgênicos (Figura 3A),
10 sendo essa diferença significativa peia análise de contrastes ($p < 0,05$). Os eventos transgênicos não foram estatisticamente diferentes quando comparados entre si, exceto o evento GmFSMiHg- 4IT3 (Figura 6B). Então, plantas transformadas com o cassete de expressão da presente invenção apresentaram, portanto, elevada resistência contra nematoides.
15

REIVINDICAÇÕES

1. Um cassete de expressão compreendendo:
 - (i) um promotor funcional em planta;
 - (ii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 2;
 - (iii) um fragmento sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 3;
 - (iii) uma sequência separadora;
 - (iv) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 5;
 - (v) um fragmento anti-sense substancialmente similar à SEQ ID NO: 6;
 - (vi) um terminador funcional em planta.
2. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do promotor funcional em plantas ser induzido por nematoides
3. Cassete de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato do promotor funcional em plantas ser substancialmente similar à SEQ ID NO 1.
4. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato da sequência separadora ser um íntron.
5. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato do íntron ser selecionado do grupo consistindo de íntron pdk, íntron catalase da mamona, íntron Delta 12 desnaturase de algodão, Delta 12 desnaturase de Arabidopsis, íntron ubiquitina de milho, íntron de SV40, íntrons do gene da malato sintase.
6. Cassete de expressão de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato do íntron ser substancialmente similar à SEQ ID NO 4.
7. Cassete de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que as sequências sense e anti-sense de (ii, iii) e (iv, v) pertencem a um gene que codifica um fator de splicing.
8. Cassete de expressão de acordo com qualquer uma das rei-

vindicações 1 a 7, em que as sequências de (ii, iv) e (iii, v) são de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne incognita*, respectivamente.

9. Cassete de expressão caracterizado por possuir uma sequência substancialmente similar à SEQ ID NO 8.

5 10. Vetor, compreendendo o cassete como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

10 11. Método para produção de uma planta resistente a múltiplas espécies de nematoides, compreendendo inserir em uma célula vegetal um cassete como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e regenerar uma planta a partir da referida célula vegetal.

12. Planta resistente a múltiplas espécies de nematoides, possuindo um cassete de expressão como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 integrado ao seu genoma.

15 13. Planta de acordo com a reivindicação 12, em que a planta é uma planta de soja.

14. Semente de uma planta como definida na reivindicação 13.

15. Produto, produzido a partir de material extraído de uma planta como definida na reivindicação 12.

20 16. Método para o controle de nematoides em uma plantação, compreendendo cultivar planta como definida em qualquer uma das reivindicações 12 e 13.

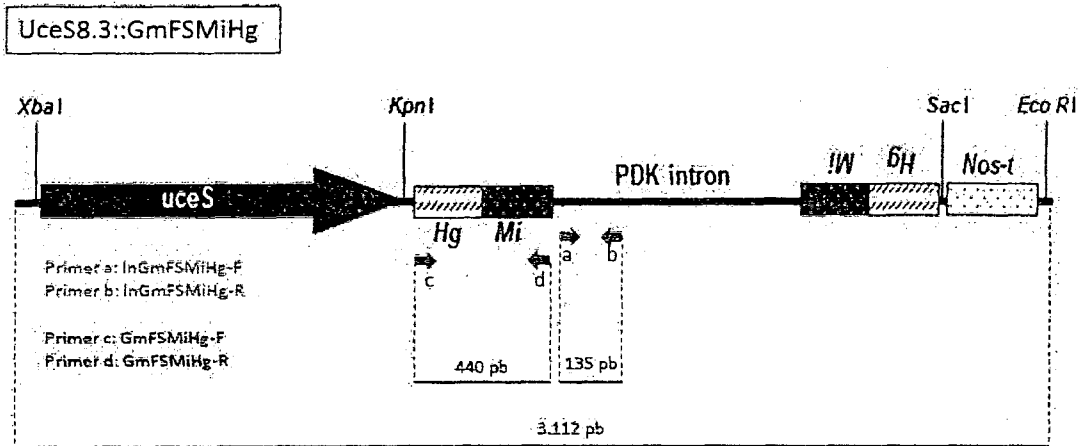


FIGURA 1

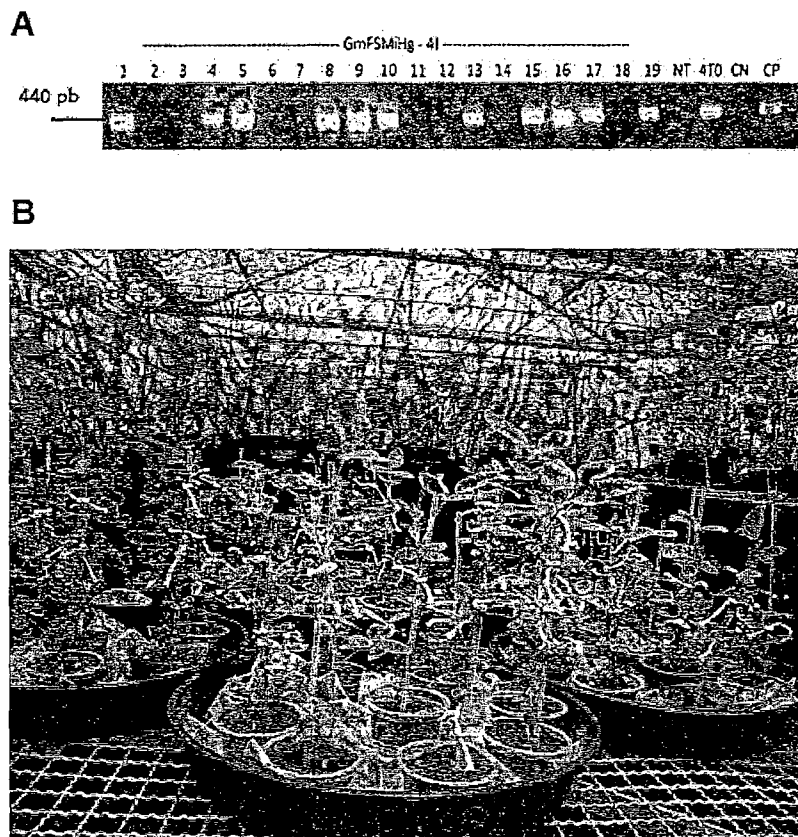
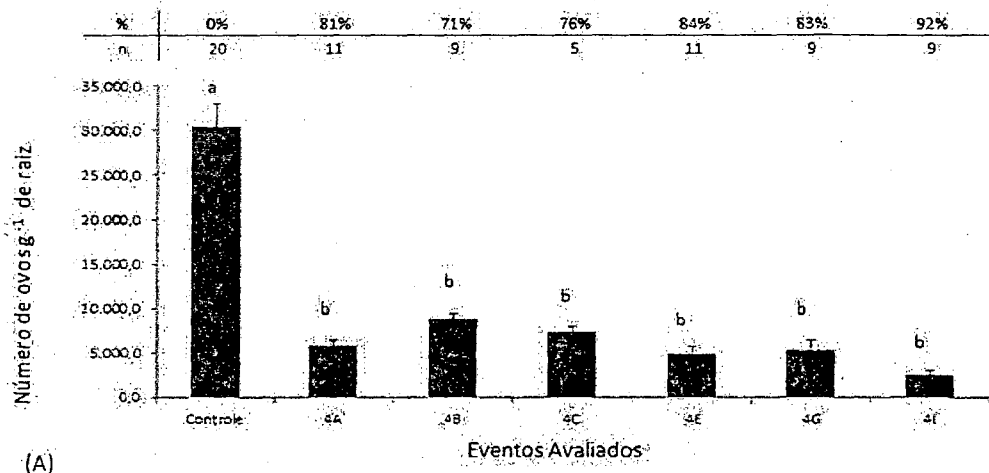
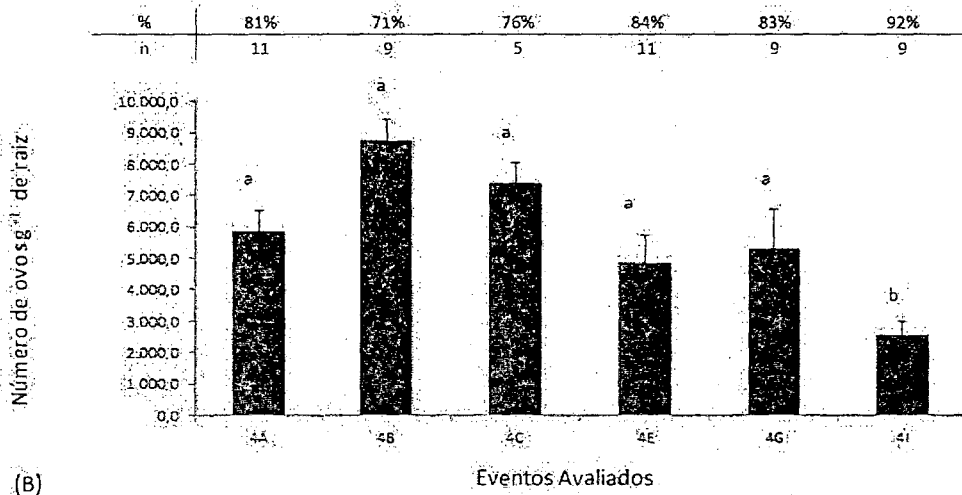


FIGURA 2



(A)



(B)