

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 1002675-4 A2**

(22) Data de Depósito: 06/08/2010
(43) Data da Publicação: 27/03/2012
(RPI 2151)



* B R P I 1 0 0 2 6 7 5 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/29
A01H 1/00
A01H 5/00

(54) Título: CÉLULA TRANSFORMADA, MATERIAL VEGETAL TRANSGÊNICO, MÉTODO DE PROTEÇÃO CELULAR, USO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UREASES

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Arlete Beatriz Becker Ritt, Beatriz Wiebke Strohm, Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini, Giancarlo Pasquali, Lauro Bucker Neto, Maria Helena Bodanese Zanettini, Marta Bencke, Márcia Maria Auxiliadora Naschenveng Pinheiro Margis

(57) Resumo: CÉLULA TRANSFORMADA, MATERIAL VEGETAL TRANSGÊNICO, MÉTODO DE PROTEÇÃO CELULAR, USO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UREASES. A presente invenção descreve células transformadas compreendendo material transgênico, material vegetal transgênico, métodos de proteção celular, uso e composição compreendendo ureases.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

CÉLULA TRANSFORMADA, MATERIAL VEGETAL TRANSGÊNICO, MÉTODO DE PROTEÇÃO CELULAR, USO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UREASES

5 **Campo da Invenção**

A presente invenção descreve células transformadas compreendendo material transgênico e métodos de proteção celular compreendendo ureases ubíquas. A presente invenção se situa no campo da genética e agricultura.

10 **Antecedentes da Invenção**

Soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] é uma das plantas cultivadas de grande interesse econômico por seu conteúdo protéico e lipídico, bem como por sua capacidade de fixar nitrogênio através de simbiose com microorganismos do solo. A soja cultivada é uma espécie de planta anual, diplóide ($2n=40$), de autofecundação, nativa da China e explorada no Oriente há mais de cinco mil anos. Esta leguminosa é uma cultura de grande importância econômica, atingindo, atualmente, uma produção de cerca de 200 milhões de toneladas do grão no mundo. No Brasil, esta cultura foi estabelecida a partir da década de 1960 e, hoje, é uma das espécies vegetais de maior interesse econômico do país, que, segundo dados da FAO, nos últimos anos figurou como segundo maior produtor em nível mundial, atrás apenas dos Estados Unidos.

Doenças da soja

Adversidades bióticas e abióticas estão entre os fatores que limitam a distribuição geográfica das culturas e acarretam reduções significativas no crescimento e produtividade de espécies economicamente importantes. As instabilidades do ambiente que prejudicam as culturas derivam principalmente da expansão das áreas cultivadas, da monocultura, da utilização de práticas agrícolas inadequadas e das mudanças climáticas.

A suscetibilidade das plantas a inúmeras doenças aparece entre as causas mais importantes de redução da produtividade. O cenário é agravado pela dificuldade no controle dos agentes causadores destas doenças. No Brasil já foram identificadas aproximadamente 40 doenças de soja causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus. A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo da condição climática de cada safra.

Os fungos patogênicos atacam diferentes estruturas das plantas em diversos estádios de seu desenvolvimento (Bonato 2000; Suzuki & Yuyama, 2005). Abaixo estão listadas as doenças causadas por fungos e seus agentes causadores conforme Vidor et al. (2004).

Atualmente, a maior ameaça ao cultivo da soja é a ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, preocupando tanto pesquisadores quanto produtores pela extensão do prejuízo (Goellner et al. 2010, Pragas e Doenças 2007). O fungo foi identificado pela primeira vez na América do Sul em 2001, disseminando-se consideravelmente nos anos seguintes (Freire et al. 2008). Na safra 2002/2003 a doença chegou ao Brasil, causando perdas estimadas de 2 bilhões de reais (Yorinori et al. 2005). A doença é favorecida por chuvas bem distribuídas e longos períodos de molhamento. A temperatura ideal para o seu desenvolvimento varia entre 18-28°C. Em condições ótimas, as perdas na produtividade podem variar de 10% a 80% (Vidor et al. 2004).

Fungos da espécie *Rhizoctonia solani* causam várias doenças de soja, dentre elas a mela da soja e a podridão da raiz e da base da haste (ver relação acima). O fungo se desenvolve bem em clima quente e chuvoso e sobrevive no solo através de escleródios, saprofiticamente em restos de cultura e em hospedeiros alternativos ou eventuais. A "mela da soja" ocorre no Mato Grosso, Tocantins, Maranhão e Roraima e pode causar reduções de 30-60% na produtividade. A podridão da raiz e da base da haste está restrita à região dos Cerrados e associada a anos de intensa precipitação. A incidência da doença varia de algumas plantas mortas a extensas reboleiras, onde se misturam plantas mortas e plantas sem sintomas (Vidor et al. 2004).

O cancro da haste é causado por *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* e *Phomopsis phaseoli* f.sp. *meridionalis*. A doença está disseminada em todas as regiões produtoras de soja do País e até a safra 96/97, causou perda estimada em US\$ 0,5 bilhão. O fungo multiplica-se nas primeiras plantas infectadas e, posteriormente, durante a entressafra, nos restos de cultura. O cancro da haste pode causar perda total da lavoura. A seca da haste e da vagem também é causada por *Phomopsis* spp. A doença é uma das mais tradicionais da soja e, anualmente é responsável pelo descarte de lotes de sementes. Seu maior dano é observado em anos quentes e chuvosos (Vidor et al. 2004).

A podridão vermelha da raiz (PVR) é causada por *Fusarium solani* f.sp. *glycines*. A doença está disseminada por todo o País e ocorre em reboleiras ou de forma generalizada na lavoura (Vidor et al. 2004).

Transformação genética da soja

O controle das doenças através de resistência genética é o modo mais eficaz e econômico (EMBRAPA, 1994). Esforços direcionados ao melhoramento genético dessa espécie pelos métodos convencionais têm sido limitados pela estreita variabilidade genética entre as cultivares e pela incompatibilidade sexual com espécies afins (Bodanese-Zanettini et al.1996). Além disso, o curto período de resistência de cultivares de soja a doenças fúngicas devido à rápida evolução dos patógenos (Li et al., 2004) e a inexistência de cultivares resistentes a certos fungos (EMBRAPA, 1994) são desafios permanentes nos programas de melhoramento. Por isso, a obtenção de plantas geneticamente modificadas que apresentem resistência a moléstias fúngicas é uma estratégia promissora e factível.

Um grande número de genes é ativado e outro reprimido, sob condições de estresse, tais como a infecção por fungos. O controle da expressão gênica ocorre em diferentes níveis e o estudo de como a expressão individual de cada gene contribui na resposta final em termos celulares, fisiológicos e agrônômicos tem possibilitado o desenvolvimento de estratégias para a obtenção de plantas mais tolerantes. Atualmente, diversos genes que conferem

resistência a fungos estão sendo isolados, caracterizados e expressos em plantas (Punja, 2001; Li et al., 2004).

Para garantir o sucesso dos programas de introdução de genes, são necessários protocolos eficientes de cultura *in vitro* e de transformação, que permitam a regeneração de plantas totalmente transformadas (não quiméricas).

Em nosso laboratório (Laboratório de Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas, do Departamento de Genética da UFRGS) foi estabelecido um protocolo de transferência de genes para soja, via bombardeamento, utilizando como alvo o tecido embriogênico em proliferação (Droste et al. 2002). Utilizando este protocolo, foram obtidas plantas transgênicas da cultivar IAS5, que expressam um gene modificado *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* (Homrich et al. 2008), plantas das cultivares Bragg e IAS5, que expressam um gene que codifica uma osmotina de *Solanum nigrum* (Weber, 2007), dentre outras (dados ainda não publicados).

Por outro lado, a transformação de embriões somáticos pelo sistema *Agrobacterium* tem sido um desafio (Trick et al. 1997, 1998). Os esforços são justificados pela possibilidade de integração de menor número de cópias do transgene ao genoma vegetal, menor probabilidade de rearranjos e fragmentação do transgene (Tinland e Hohn, 1995; Kohli et al., 2003). Nosso grupo de pesquisa estabeleceu, de forma pioneira, um protocolo combinando os métodos de bombardeamento e o sistema *Agrobacterium* (Droste et al. 2000). Neste primeiro trabalho, foram obtidos embriões somáticos transformados, embora não tenham sido regeneradas plantas transgênicas. Desde então, vários experimentos foram realizados visando a otimização desse protocolo. Tal otimização foi conseguida pela identificação de uma combinação de antibióticos eficiente para suprimir a bactéria após o co-cultivo, com efeitos fitotóxicos mínimos sobre o tecido embriogênico alvo (Wiebke et al. 2006).

25 **Ureases**

As ureases são enzimas níquel-dependentes, multifuncionais, com vários domínios de atividade e que respondem a situações de estresse (Carlini

e Polacco 2008). Vários grupos de organismos sintetizam essa enzima, dentre eles bactérias, fungos e plantas.

A atividade ureolítica foi a primeira função atribuída a ureases, sendo a mais estudada (Sirko e Brodzik 2000, Carlini e Polacco 2008, Follmer 2008). A uréia constitui a maior parte do nitrogênio resultante do metabolismo de organismos vivos e a urease catalisa a hidrólise da uréia, dando origem a amônia e carbamato. Em pH fisiológico, o carbamato é hidrolisado espontaneamente para formar gás carbônico e uma segunda molécula de amônia, composto que pode ser aproveitado pelo organismo. A importância desta enzima, portanto, é fornecer o nitrogênio necessário para o desenvolvimento dos seres vivos (Moblely e Hausinger 1989). Poucas enzimas requerem níquel para desempenhar suas atividades catalíticas. A ligação do níquel à urease é muito precisa e forte. Sua incorporação *in vivo* requer um conjunto de proteínas acessórias, que parecem atuar como chaperonas urease-específicas (Moncrief e Hausinger 1996).

As ureases de plantas e fungos são proteínas homo-oligoméricas com subunidades idênticas de 90-kDa, enquanto as ureases de bactérias são multímeros de duas ou três subunidades. Independentemente do organismo, as ureases possuem grande similaridade na sequência de aminoácidos, o que sugere a existência de uma proteína ancestral comum, similaridades na estrutura tridimensional e conservação nos mecanismos catalíticos. Tanto ureases de bactérias, quanto de plantas apresentam várias atividades biológicas que são independentes da atividade ureolítica (Follmer et al. 2004, Olivera-Severo et al. 2006, Becker-Ritt et al. 2007).

Estudos de localização sub-celular das ureases de bactérias indicam que elas estão associadas à fração solúvel da célula, com exceção de ureases de *Helicobacter pylori* que em sua maioria podem localizar-se na superfície da célula (Moblely et al. 1995). Trabalhos para localização sub-celular de ureases de plantas, utilizando técnicas mais apuradas e modernas, são necessários.

As ureases de plantas mais bem caracterizadas bioquimicamente são as de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), espécie em que três isoformas

estruturais foram encontradas (JBU, canatoxina e JBUREII). Em sementes desta espécie encontra-se a urease majoritária (Sumner 1926, Pires-Alves et al. 2006), que foi a primeira enzima a ser cristalizada por James. B. Sumner (1926) e apresenta importância histórica por demonstrar definitivamente a natureza protéica das enzimas. Oitenta e três anos mais tarde, sua estrutura tridimensional foi resolvida (Balasubramanian e Ponnuraj 2010). Esta é a primeira descrição tridimensional de uma urease de origem vegetal e representa um avanço importante para a compreensão de suas propriedades biológicas. A canatoxina foi isolada e caracterizada por Carlini e Guimarães em 1981 e, 20 anos mais tarde, a mesma foi identificada como uma isoforma de urease (Follmer et al. 2001). Uma terceira urease (JBUREII) foi encontrada em diferentes etapas de desenvolvimento das flores, em embriões em desenvolvimento e em brotos (Pires-Alves et al. 2003).

Para soja foram descritas até o momento duas isoenzimas estruturais, codificadas por dois genes independentes, que compartilham 87% de identidade na sequência de aminoácidos (Goldraij et al. 2003). A urease embrião-específica, codificada pelo gene *Eu1*, é uma proteína abundante nas sementes, enquanto que a urease ubíqua, codificada pelo gene *Eu4*, é encontrada em menor quantidade em todos os órgãos da planta (Torisky et al 1994, Goldraij et al. 2003). Além das proteínas estruturais, foram identificadas em soja duas proteínas acessórias (*Eu2* e *Eu3*) codificadas por genes não ligados (Polacco et al. 1999, Freyermuth et al. 2000).

Com o intuito de determinar a função das ureases de soja, esforços foram direcionados para obtenção de mutantes. A coleção de mutantes pertence à Universidade de Missouri, EUA. Para urease embrião-específica, mutantes nulos, denominados *eu1/eu1*, foram obtidos com sucesso, enquanto que os mutantes para a urease ubíqua (*eu4/eu4*) acumulam uma proteína deficiente na atividade ureolítica devido a uma mutação de ponto na região de inserção do níquel. A partir da análise destas plantas foi demonstrado que a urease ubíqua sozinha é responsável pela degradação da uréia em todos os tecidos da planta (Stebbins et al. 1991, Witte et al. 2002). Por sua vez, a

ausência da urease embrião-específica não acarretou modificações nas condições fisiológicas das plantas, sugerindo seu envolvimento em outras funções (Stebbins et al. 1991).

Mutantes nulos para proteínas acessórias *eu3/eu3* ou *eu2/eu2*, também foram obtidos e determinam a ausência total de atividade ureásica nas plantas (Polacco et al. 1999, Freyermuth et al. 2000). O fenótipo destes mutantes mimetiza a privação total da planta a nitrogênio e acarreta o acúmulo de uréia e manchas necróticas na folhas (Stebbins et al. 1991). Sementes obtidas a partir das plantas *eu3/eu3* tendem a perder a viabilidade de germinação mais rapidamente que sementes com ureases ativas. Embora não tenham sido conduzidos experimentos definitivos, as sementes também parecem mais suscetíveis a ataques por microorganismos (Carlini e Polacco 2008).

Apesar de conhecidas e estudadas a partir de 1926 (Sumner 1926), as funções biológicas e o modo de ação das ureases ainda não foram totalmente compreendidos e merecem atenção. O fato de a urease ser amplamente distribuída em sementes de leguminosas sugere um papel importante na germinação e na defesa química das sementes (Zonia et al. 1995; Polacco e Holland 1993). Trabalhos recentes demonstraram que as ureases purificadas a partir de plantas apresentam uma toxicidade contra insetos e fungos, com atividade independente da catalítica. A urease embrião-específica de soja e as ureases de feijão de porco purificadas foram letais quando injetadas ou adicionadas a dieta de insetos das classes Hemiptera e Coleoptera, tais como *Rhodnius prolixus*, *Callosobruchus maculatus* (Carlini et al. 1997), *Nezara viridula* (Carlini e Grossi-de-Sá 2002), *Dysdercus peruvianus* (Follmer et al. 2004, Stanisçuaski et al. 2005) e *Triatoma infestans* (Tomazetto et al. 2007). Foi demonstrado que a atividade inseticida das ureases de feijão de porco está restrita ao trato digestivo quando da presença de catepsinas (próprio das classes Hemiptera e Coleoptera), que degradam a proteína e liberam um peptídeo tóxico de 10 kDa (Carlini et al. 1997). A sequência de nucleotídeos correspondente ao peptídeo entomotóxico foi isolado e clonado a partir do gene *jburell* (Mulinari et al. 2004, Mulinari et al., 2007). Insetos com digestão

baseada em tripsina (próprio da classe Lepidoptera) não são afetados por ureases em sua forma nativa, apenas pelo peptídeo. Por sua vez, em ratos não foram observados sintomas de toxicidade, mesmo quando o peptídeo foi adicionado à dieta (Mulinari et al. 2007).

5 Até o momento, um menor número de estudos foi realizado para compreender a atividade antifúngica das ureases. Sabe-se, no entanto, que, em concentração sub-micromolar, as ureases purificadas de soja (embrião-específica), feijão de porco (majoritária) e algodão inibem o crescimento vegetativo *in vitro* de fungos filamentosos (Becker-Ritt et al. 2007, Menegassi et al. 2008). Embora menos expressiva, a atividade fungicida também foi encontrada para urease recombinante de *H. pylori* (Becker-Ritt et al. 2007). A microscopia eletrônica de fungos tratados com ureases sugere plasmólise e injúrias à parede celular (Becker-Ritt et al. 2007). Foi demonstrado que a atividade fungicida das ureases é independente das atividades inseticida e ureolítica, uma vez que ureases tratadas com inibidores irreversíveis da atividade ureolítica persistiram inibindo o crescimento de fungos, enquanto o peptídeo inseticida não desempenhou esse papel (Becker-Ritt et al. 2007, Menegassi et al. 2008).

Além disso, foi demonstrado que o ácido abscísico (ABA) modula a expressão da urease JBUREII de feijão de porco (Pires-Alves et al. 2003), 20 indicando um possível envolvimento das ureases vegetais com a resposta a estresses abióticos, tais como seca, salinidade e mudança de temperatura.

O estudo das ureases *in vivo* é de fundamental importância para o esclarecimento de seu papel real na resposta das plantas a diversas condições 25 de estresse. A manipulação da expressão dos genes que codificam ureases pode auxiliar na determinação destas funções e no desenvolvimento de plantas mais resistentes.

O desenvolvimento da Genômica Funcional pelo uso das tecnologias do RNAi, para o silenciamento gênico, e da superexpressão de genes relacionados 30 à resposta da planta a agentes estressores, tem proporcionado o acesso cada

vez mais amplo ao genoma das espécies, permitindo a identificação de genes e rotas metabólicas relacionadas aos mais variados tipos de estresse.

No âmbito patentário, foram encontrados alguns documentos relevantes à presente invenção.

5 Dois pedidos de patente foram depositados para proteger a utilização das ureases quanto a sua atividade inseticida. O primeiro visa a utilização de extratos purificados de canatoxina para o controle biológico (Carlini, C.R., Gombarovits, M.E.C., Ferreira-DaSilva, C.T. (2000). Peptídeo entomotóxico da canatoxina: processo de produção. Privilégio de invenção. PI 0003334-0, depósito 06 de junho de 2000). O segundo visa proteger a utilização do peptídeo inseticida em programas de transformação de plantas (Mulinari, F., Pires-Alves, M., Moraes, M.G., Kurtenbach, E., Carlini, C.R., Grossi-de-Sá, M.F. (2004). Toxina praguicida, construção gênica e método de controle de pragas, pedido de patente PI 0001120, depósito 08 de abril de 2004). Ambos, 10 apesar de estarem relacionados à presente invenção, não antecipam nem sugerem o escopo aqui reivindicado. 15

Portanto, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e 20 atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona novos e inventivos resultados sobre ureases, especialmente sobre seu uso em transformações 25 celulares e seu papel na proteção das plantas, quando as mesmas são infectadas por fungos. Em especial, as transformações da presente invenção envolvendo a urease ubíqua de soja estão relacionadas à expressão do gene *eu4* nas plantas.

É um objeto da presente invenção uma célula transformada 30 compreendendo material biológico transgênico capaz de modular a atividade de sequências relacionadas à urease ubíqua e/ou seus fragmentos.

É um objeto adicional da presente invenção um material vegetal transgênico compreendendo pelo menos um material biológico transgênico capaz de modular a atividade de sequências relacionadas à urease ubíqua e/ou seus fragmentos.

5 Em uma realização preferencial, o material vegetal da presente invenção é obtido utilizando um vetor biológico compreendendo pelo menos uma sequência nucleotídica capaz de expressar urease ubíqua e/ou seus fragmentos; e pelo menos um promotor adequado.

É ainda um objeto adicional da presente invenção, um método de
10 proteção celular compreendendo as etapas de:

a) obter material biológico relacionado a ureases e/ou seus fragmentos;

b) contactar o material de a) com o material biológico do organismo que necessita de proteção.

15 É ainda um objeto da presente invenção o uso de ureases manipuladas geneticamente contra fungos.

É ainda um objeto adicional da presente invenção, uma composição agroquímica compreendendo:

a) material biológico relacionado a ureases e/ou seus fragmentos;

20 b) veículo aceitável.

Em uma realização preferencial, a modulação da atividade compreende a superexpressão do gene *eu4*.

Em uma realização preferencial, o material biológico do organismo que necessita de proteção é qualquer parte da soja.

25 Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

30 A figura 1 mostra o diagrama da região do T-DNA do vetor binário pH7WG2DureU utilizado para a transformação de soja (adaptado de Karimi et

al. 2002). Abreviações: RB – borda direita do T-DNA, LB – borda esquerda do T-DNA, *hpt* – gene da higromicina fosfotransferase, P35S – promotor do gene 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), T35S - terminador do gene CaMV 35S, *EgfpER* – proteína de fluorescência verde potencializada, *ProID* - 5 promotor do gene de raiz loci D, *ureU* – urease ubíqua da soja, *attB1* e *attB2* – sítios de recombinação LR, kb – 1000 pares de bases.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma 10 das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

Célula transformada

É um objeto da presente invenção uma célula transformada compreendendo material biológico transgênico capaz de modular a atividade 15 de sequências relacionadas à urease ubíqua e/ou seus fragmentos.

Material vegetal transgênico

É um objeto adicional da presente invenção um material vegetal transgênico compreendendo pelo menos um material biológico transgênico capaz de modular a atividade de sequências relacionadas à urease ubíqua 20 e/ou seus fragmentos.

Em uma realização preferencial, o material vegetal da presente invenção é obtido utilizando um vetor biológico compreendendo pelo menos uma sequência nucleotídica capaz de expressar a urease ubíqua e/ou seus fragmentos; e pelo menos um promotor adequado.

Método de proteção celular

É ainda um objeto adicional da presente invenção, um método de proteção celular compreendendo as etapas de:

- a) obter material biológico relacionado a ureases e/ou seus fragmentos;
- 30 b) contactar o material de a) com o material biológico do organismo que necessita de proteção.

Uso de ureases manipuladas geneticamente

A presente invenção descreve o uso de ureases manipuladas geneticamente contra fungos.

Composição para uso agrícola

5 É ainda um objeto adicional da presente invenção, uma composição agroquímica compreendendo:

- a) material biológico relacionado a ureases e/ou seus fragmentos;
- b) veículo agriculturalmente aceitável.

Em uma realização preferencial, a modulação da atividade compreende
10 a superexpressão do gene *eu4*.

Em uma realização preferencial, o material biológico do organismo que necessita de proteção é qualquer parte da soja.

Urease Ubíqua

A urease ubíqua da presente invenção compreende uma isoenzima
15 estrutural, codificada pelo gene *Eu4*. Atualmente se conhece que a urease ubíqua é comumente encontrada em pequenas quantidades em todos os órgãos da planta.

Material Biológico

O material biológico útil na presente invenção inclui, mas não se limita
20 aos elementos como DNA, RNAs e/ou proteínas ou peptídeos, inteiros ou parciais, encontrados em células e/ou tecidos e/ou órgãos de um organismo eucarioto e/ou procarioto. Em especial, na presente invenção é essencial pelo menos um material biológico relacionado à urease ubíqua. Em especial, o material biológico utilizado na construção gênica da presente invenção é o
25 DNA. Em especial, o material biológico utilizado na modulação da atividade celular da presente invenção é o RNAm e o RNAi.

O material biológico transgênico da presente invenção compreende um material biológico proveniente de organismo distinto do hospedeiro e/ou que foi submetido a um tratamento artificial fora do hospedeiro, e que foi
30 posteriormente inserido na planta de estudo. Em uma realização preferencial, a

planta de estudo é a soja [*Glycine max* (L.) Merr.]. Em uma realização preferencial, o material biológico transgênico contém os transgenes *ureU* e *hpt*.

Modulação da Atividade

Entende-se por “modulação da atividade” qualquer modificação na expressão de elementos como DNA, RNA e/ou proteínas nas células-alvo e/ou qualquer modificação no comportamento dessas células durante e/ou após a expressão de genes relacionados a ureases nas células-alvo. Em uma realização preferencial, na presente invenção a modulação da atividade tem o intuito de promover tanto a superexpressão do gene *eu4*, quanto o seu silenciamento. Em especial, na presente invenção a modulação será com o intuito de promover a superexpressão do gene *eu4*.

Veículo aceitável

O veículo aceitável da presente invenção compreende qualquer formulação contendo excipientes e carreadores agriculturalmente aceitáveis bem conhecidos por técnicos no assunto, que proporcionem o desenvolvimento de composições convenientes para uso agrícola.

Exemplo 1. Realização Preferencial

Gene selecionado para o estudo

O gene *Eu4* (AY230156), que codifica a urease ubíqua da soja, foi selecionado para o estudo funcional.

Desafio de plantas selvagens de soja com *P. pachyrhizi* para estudo de expressão

O experimento de infecção por *P. pachyrhizi* foi realizado em abril de 2009, na sede da Embrapa Soja (Londrina, PR). A cultivar de soja Embrapa48 (genótipo suscetível a *P. pachyrhizi*) e o acesso PI561356 (genótipo resistente) foram crescidos em casa de vegetação por três semanas. Durante todo o experimento as plantas foram mantidas a temperatura de 20 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16/8 h luz/escuro, intensidade luminosa de $22,5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 60 a 90%. As plantas foram inteiramente borrifadas com suspensão de uredósporos de *P. pachyrhizi* (concentração final de $2,6 \times 10^4$

esporos/mL), coletados a partir de folhas de soja infectada. Plantas controle foram tratadas com água. Após a inoculação, todas as plantas foram cobertas por plásticos para manter a umidade necessária para a infecção. Uma folha de cada planta foi coletada 1, 12, 24, 48, 96 e 192 h após a inoculação, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80 °C. O experimento foi realizado com três plantas/cultivar/tratamento.

Construção do vetor de transformação

A construção contendo a sequência completa de 2514 bp do cDNA da urease ubíqua da cultivar norte-americana de soja Willians 82, clonada em pGEX4-T2, foi gentilmente cedida ao nosso grupo pelo Dr. Joseph Polacco (Universidade de Missouri, EUA). A sequência completa do cDNA foi amplificada utilizando *primers* específicos (Quadro 1). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µl, contendo 5 µl de tampão 10x, 1 µl de dNTPs 10 mM, 2,5 µl de cada *primer* 10 mM, 1 µl Pfu Taq DNA Polimerase (2,5 U/µl - Fermentas), 37 µl de água milli-Q estéril e 1 µl de plasmídeo (10 ng/µl). As condições utilizadas para a polimerização foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 42 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 3 minuto e extensão final a 72 °C por 5 min.

O produto de PCR foi clonado em pENTR/D-TOPO® (Gateway® Technology, Invitrogen) e, em seguida, recombinado em pH7WG2D (Karimi et al. 2002). A confirmação da integração e da orientação do gene no plasmídeo foi confirmada por sequenciamento completo do gene da urease, de parte do promotor e do terminador. A Figura 1 ilustra a região do T-DNA do pH7WG2D*UreU*. As construções contendo os fragmentos de interesse foram mantidas em cepa X-L1 Blue (Stratagene) de *Escherichia coli*. O vetor pH7WG2D*UreU* foi transformado em *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

Quadro 1. *Primers* utilizados em PCR.

Alvo	<i>Primer</i>	Orientação	Sequência
cDNA	GmUreU	Direta	5'-CACCTTAAAAATGAAACTG-3'

completo de <i>Eu4</i>		Reversa	5'- TTAAAAGAGGAAGTAATTTCCG -3'
DNA transgênico <i>hpt</i>	<i>hpt</i>	Direta	5'- GAGCCTGACCTATTGCATCTCC - 3'
		Reversa	5'- GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGG -3'
DNA transgênico P35S+ <i>ureU</i>	P35S	Direta	5'- CGCACAATCCCCTATCCTT -3'
	<i>ureU</i>	Reversa	5'- ATGCTAGTTCAAGGTTTCCATTCT -3'

Transformação genética da soja

Embriões somáticos de soja das cultivares IAS5 e Bragg foram induzidos a partir de cotilédones imaturos e proliferados conforme descrito por Droste et al. (2002). Os conjuntos de embriões globulares foram mantidos em cultura por oito meses, com transferência para meio fresco a cada 14 dias.

Os tecidos embriogênicos foram submetidos à transformação por bombardeamento de partículas ou sistema integrado bombardeamento/*Agrobacterium*. O bombardeamento foi realizado em acelerador de partículas de baixa pressão "particle inflow gun" (PIG) descrito por Finer et al. (1992), utilizando os procedimentos de Droste et al. (2002). A transformação via sistema integrado bombardeamento/*Agrobacterium* foi realizada conforme descrito por Droste et al. (2000) com as modificações propostas por Wiebke et al. (2006). Sete placas contendo 15 conjuntos embriogênicos/placa, com aproximadamente 0,67 mg/conjunto, foram preparadas para o bombardeamento, enquanto 10 placas foram utilizadas no experimento de transformação por bombardeamento/*Agrobacterium*.

Após três meses de seleção em meio de cultura contendo 25 mg/L higromicina-B, tecidos embriogênicos higromicina-resistentes puderam ser visualizados e cultivados separadamente em meio fresco sem antibiótico para o estabelecimento de possíveis linhagens que correspondem a eventos independentes de transformação.

A histodiferenciação, a conversão dos embriões em plantas e a aclimação foram realizadas de acordo com Droste et al. (2002). As plantas

foram transferidas para vasos contendo 3 kg de solo orgânico para completo desenvolvimento em casa de vegetação. Plantas derivadas de tecidos embriogênicos não transformados, mas submetidos às mesmas condições de cultura *in vitro*, foram regeneradas e utilizadas como controle para
5 caracterização molecular e fenotípica, bem como para bioensaios.

Obtenção da progênie

Para análise da progênie, as sementes T₁, obtidas a partir da autopolinização das plantas T₀, foram semeadas em vasos contendo 1 kg de solo orgânico e mantidas em casa de vegetação.

10 Análises moleculares

Análises da expressão GFP

O monitoramento da integração do T-DNA ao genoma vegetal foi realizado através da visualização da expressão GFP sob luz azul, em microscópio de fluorescência Olympus® (filtro BP; comprimentos de onda de
15 excitação e emissão de 488 e 505-530 nm, respectivamente). As imagens foram obtidas através do software QCapture Pro™ 6 (QImaging®).

Extração de DNA

O DNA genômico das plantas T₀ e T₁ foi extraído a partir de tecidos das folhas pelo método CTAB (Doyle e Doyle 1987) com modificações.

20 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Análises por PCR foram realizadas para confirmação da integração estável dos transgenes *ureU* e *hpt*. Os *primers* foram projetados para amplificação de um fragmento de 512 bp do gene *hpt* e um fragmento recombinante de 557 bp resultante da amplificação combinada da porção 5' do
25 promotor 35S com a 3' do gene *ureU* (Quadro 1).

A reação de PCR foi realizada com 2,5 µl de tampão 10x, 1,25 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de cada *primer* 10 mM, 0,2 µl Taq DNA Polimerase (5 U/µl - Fermentas), 1 µl de DNA e água milli-Q estéril para um volume final de 25 µl. As condições utilizadas para a polimerização foram:
30 desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 52°C por 45 s, extensão a 72°C 45 s e extensão final a 72°C

por 5 min. Todas as reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Termo Hybaid.

O produto da PCR foi aplicado e resolvido em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo e o resultado foi visualizado em luz ultravioleta.

5 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi realizada com tampão Trizol (Invitrogen). Aproximadamente 2 µg de RNA livre de DNA foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA utilizando a enzima M-MLV para transcrição reversa (Invitrogen), de acordo com instrução dos fabricantes. O produto da síntese da
10 primeira fita de cDNA foi diluído 100 vezes.

PCR em tempo real (RT-qPCR)

As reações de RT-qPCR foram realizadas em aparelho StepOne Plus™ real-time PCR System (Applied Biosystem™). As condições de reação seguiram os seguintes parâmetros: uma etapa de desnaturação inicial de 5 min
15 a 94°C, seguida por 40 ciclos de 10 s a 94 °C, 15 s a 60 °C e 15 s a 72°C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas por 2 min a 40 °C para reanelamento e, então, aquecidas de 55 até 99°C com uma taxa de incremento de 0.1 °C/s para obtenção da curva de desnaturação. As reações foram feitas em um volume final de 20 µl, sendo os mesmos compostos de 2 µl de tampão
20 PCR 10x (Invitrogen), 1.2 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.4 µl de dNTPs 5 mM, 0.4 µl de cada par de *primers* específicos 10 µM, 4.95 µl de água ultra pura, 1.0 µl de SYBR Green (1:100.000, Molecular Probes Inc.) e 0.05 µl de Platinum Taq DNA polimerase (5 U/µl, Invitrogen). A este "mix", adicionou-se: 10 µl de cDNA (diluição 1:100) nas análises de expressão gênica; ou 10 µl de DNA genômico
25 em diluições seriadas (1:100, 1:1.000 e 1:10.000), para a estimativa do número de cópias do transgene. Cada reação de PCR foi realizada em quadruplicata. Reações sem cDNA/DNA foram incluídas em cada placa para controle negativo.

A temperatura de anelamento de todos os *primers* foi ajustada para
30 60°C. Uma lista contendo os *primers* utilizados nas análises por RT-qPCR encontra-se no Quadro 2. Dois pares de *primers* foram projetados para *Eu4*:

ureUbiRT1, anela na região codificante do gene e detecta tanto a expressão endógena quanto a transgênica de *Eu4*; ureUbiRT3 anela na região 3' UTR do gene *Eu4* e, por isso, detecta apenas a expressão endógena desse gene. A expressão da PR4 foi utilizada como controle positivo do tratamento com *P. pachyrhizi*.

Quadro 2. Primers utilizados nas análises por RT-qPCR.

Alvo	Primer	Direção	Sequência	Referência
cDNA e DNA <i>Eu4</i> endógeno + transgene	ureUbiRT1	Direta	5'- TGGTGATCAAAGGTGGTGAG -3'	—
		Reversa	5'- GAACTACCAGCCTTGCCAAA -3'	
cDNA <i>Eu4</i> endógeno	ureUbiRT3	Direta	5'- TCACTGTGGACCCAGAAACA -3'	—
		Reversa	5'- CTTGCTTATTGTTTTTGCCAAT -3'	
cDNA Actina II	ActII	Direta	5'- CGGTGGTTCTAT CTTGGCATC -3'	Jian et al. 2008
		Reversa	5'- GTCTTCGCTTCAA TAACCCTA -3'	
cDNA Metalloprotease	Metallo	Direta	5'- ATGAATGACGGTCCCATGTA -3'	Libault et al. 2008
		Reversa	5'- GGCATTAAGGCAGCTCACTCT -3'	
cDNA FBox	FBox	Direta	5'- AGATAGGGAAATGTTGCAGGT -3'	Libault et al. 2008
		Reversa	5'- CTAATGGCAATTGCAGCTCTC -3'	
cDNA PR4	PR4	Direta	5'- AACCTTACTCATGGCGCAGT -3'	Graham et al. 2003
		Reversa	5'- TGCTGCACTGATCTACGATTC -3'	
DNA Lectina	Lectina	Direta	5'- TACCTATGATGCCTCCACCA -3'	Schmidt et al. 2001
		Reversa	5'- GAGAACCCTATCCTCACCCA -3'	

Nas análises de expressão gênica, os resultados foram obtidos a partir de uma quantificação relativa aos genes referência "Actin II", "F-box protein family" e "Metalloprotease" através da metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrita por Livak e Schmittgen (2001). A linha de base foi determinada automaticamente e a "Rn threshold" foi estabelecida em 2000. O programa StepOne Software v2. (Applied Biosystem) foi utilizado para analisar os resultados.

A estimativa do número de cópias do transgene por RT-qPCR foi realizada através da "Quantificação relativa pela análise da curva padrão" (Shou et al., 2004). Diluições seriadas das amostras de DNA possibilitaram a obtenção de curvas-padrão relativas, em que são comparados os valores de Ct do gene alvo (*Eu4*) e de um gene endógeno (lectina), cujo número de cópias é

conhecido (4 cópias em genoma diplóide). Como controle foi utilizado DNA de plantas selvagens, que apresentam 2 cópias de *Eu4* em seu genoma diplóide.

Extração de proteínas totais

O extrato protéico bruto foi obtido a partir de tecidos foliares utilizando o
5 tampão de extração descrito por Becker-Ritt et al. (2007), composto por fosfato de sódio (NaPB) 20 mM, pH 7,5, 1 mM EDTA e 2 mM β -mecaptoetanol. O extrato de proteínas totais foi quantificado de acordo com Bradford (1976), utilizando soro de albumina bovina como padrão. Cada amostra foi testada em triplicata.

10 Ensaio bioquímico: atividade ureolítica

A atividade ureolítica de plantas transgênicas foi testada por dois métodos colorimétricos independentes. Ambos medem a liberação de amônia no meio, decorrente da degradação da uréia pela urease.

No primeiro teste, a solução indicadora de urease por mudança de pH
15 “seed chip assay” é composta de uréia 6g/L, cresol vermelho 5 mg/L, azida 20% 1 mL/L e $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{EDTA}$ 10 mL/L, pH 7 (Dr. J.C. Polacco, comunicação pessoal). Cinco discos foliares de 0,5 cm de diâmetro foram coletados de cada planta e incubados em 1 mL da solução indicadora de urease à 65 °C por 24 h.

No segundo teste, a mistura de 20 μl de extrato protéico bruto, 10 μl de uréia 100 mM, 10 μl de PBS 10 X e água para um volume final de 100 μl foi incubado a 37 °C por 45 min. A liberação de amônia foi determinada colorimetricamente por reação de fenol-hipoclorito (Weatherburn, 1967), e quantificada em espectrofotômetro 595_{nm}. Cada amostra foi testada em
25 triplicata. Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol NH_3/min a 37 °C e pH 7,5.

Análise fenotípica das plantas transgênicas

As plantas transgênicas foram avaliadas visualmente quanto ao crescimento, desenvolvimento floral, fertilidade e germinação de sementes.

30 Bioensaios com fungos

Avaliação turbidimétrica do crescimento de fungos filamentosos

Os fungos patogênicos de soja *Rhizoctonia solani*, *Phomopsis* sp. e *Fusarium solani*, bem como os não patogênicos *Curvularia lunata* and *Penicillium herguei* foram testados quanto a sua capacidade de crescimento em meio contendo o extrato protéico bruto de plantas transformadas e não transformadas conforme Becker-Ritt et al. (2007). O experimento foi realizado em placa tipo Eliza com 96 poços, com e 3 repetições por planta/fungo. Dez µl de solução de esporos (100 esporos/µl) foram inoculados em 110 µl de meio batata dextrose (Becton Dickenson Co.), pH7 e incubados a 28 °C por 16 h. Após, 50 µl de extrato protéico, contendo 15 ou 30 µg de proteínas totais, foram adicionados à suspensão de fungos. Como controles foram utilizados tampão de extração e água oxigenada 9,5%. As placas foram incubadas a 28°C e a absorbância (430 nm) medida em leitor de placa (Spectramax, Molecular Devices) 0, 24, 36, 48 e 60 horas após a adição das proteínas. O crescimento dos fungos nas horas 24, 36, 48 e 60 foi calculado proporcionalmente à absorbância obtida na hora zero, que foi considerada igual a um.

Avaliação da infecção por *P. pachyrhizi*

A avaliação da infecção por *P. pachyrhizi* foi realizada utilizando o método da folha destacada. Folhas novas foram coletadas de plantas com 2 meses. As folhas foram lavadas três vezes em água destilada estéril e cortadas em pedaços de 5 cm × 5 cm. Cada folha foi posicionada com a face abaxial voltada para cima em uma placa de petri estéril, coberta com papel filtro umedecido. As folhas foram borrifadas com 1 mL de suspensão de uredósporos (1×10^5 esporos/ml) e incubadas a 20 °C com fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro por 12 dias. O desenvolvimento da doença foi avaliado através do número total de lesões, de lesões com pústula, total de pústulas e total de pústulas abertas.

Análises estatísticas

O teste-T de Student, realizado no Microsoft® Office Excel 2007, foi utilizado para comparar os dados de expressão em nível de mRNA, de

atividade ureásica e de crescimento de fungos filamentosos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

O teste estatístico do chi-quadrado (χ^2) foi aplicado para confirmar o padrão de segregação Mendeliana esperado (3:1 plantas transgênicas: não-transgênicas).

Resultados

Perfil de expressão do gene *Eu4* em resposta a infecção por *P. pachyrhizi*

Os resultados mostram que, ao longo do período de infecção por *P. pachyrhizi*, o gene *Eu4* é diferencialmente expresso, em nível de mRNA, quando plantas de cultivar susceptível (Embrapa-48) e acesso resistente (PI561356) são comparadas. As plantas do genótipo suscetível apresentam uma indução significativa da expressão de *Eu4* logo no início do processo de infecção (1 e 12 h), seguida por uma forte repressão às 24h. Já no genótipo resistente, observa-se um perfil de expressão exatamente contrário: repressão significativa da expressão nas primeiras horas, com forte indução 24 h após a inoculação do patógeno. O perfil de expressão do gene *PR4*, cujo padrão de expressão em respostas a lesões é conhecido em soja (Graham et al. 2003), confirmou a validade do experimento.

Obtenção de plantas transgênicas

Dois experimentos independentes de transformação foram conduzidos com o objetivo inicial de gerar plantas que super-expresssem a urease ubíqua, visando maior resistência a fungos.

Três meses após a transformação, os tecidos embriogênicos higromicina-resistentes foram selecionados visualmente, contados e cultivados separadamente para o estabelecimento e proliferação das linhagens independentes (Tabela 1). Conjuntos de embriões higromicina resistentes foram proliferados por um mês e, então, transferidos para meio de maturação. Um grande número de embriões somáticos histodiferenciados foi obtido. Os embriões histodiferenciados foram transferidos para o meio de conversão e deram origem a plântulas bem desenvolvidas que foram transplantadas *ex vitro* (Tabela 1). Todas as plantas derivadas de um único ponto de crescimento de

tecido higromicina-resistente foram consideradas plantas clonais. Um total de 30 plantas atingiram a maturidade e floresceram.

5 **Tabela 1.** Número de conjuntos embriogênicos higromicina-resistentes, de embriões histodiferenciados e de plantas obtidos a partir dos experimentos de transformação.

	Experimento I (bombardeamento)		Experimento II (bombardeamento/ <i>Agrobacterium</i>)	
	IAS5	Bragg	IAS5	Bragg
Conjuntos higromicina-resistentes	18	6	5	19
Embriões histodiferenciados	283	53	144	475
Embriões convertidos em plântulas	38	0	16	19
Plantas adultas	26	0	1	3
Plantas com sementes	21	0	0	1

Das 30 plantas obtidas, 22 produziram sementes. Destas, 21 plantas de IAS5, representando 3 eventos independentes de transformação foram obtidas a partir do bombardeamento e uma de Bragg a partir do sistema integrado bombardeamento/*Agrobacterium*.

Caracterização molecular das plantas transgênicas

15 A integração dos transgenes nos tecidos da soja foi monitorada durante todo o processo de regeneração através da visualização da expressão GFP.

A condição transgênica de todas as plantas adultas obtidas (30) foi confirmada por PCR e o número de cópias extras do gene *Eu4* integradas ao genoma foi obtido por RT-qPCR (Tabela 2).

Tabela 2. Número de cópias extras do gene *Eu4* integradas ao genoma das plantas.

Método de transformação	Cultivar	Evento	Número de cópias
Bombardeamento	IAS5	A1	10-14
		A2	ND*
		A3	12-14
		A8	14
Bombardeamento/ <i>Agrobacterium</i>	IAS5	4F	1
	Bragg	5C	1
		7E	2-3

* ND – valor não determinado.

5 O nível de expressão de mRNA do gene *Eu4* em diferentes plantas transformadas foi determinado por RT-qPCR. Dois pares de *primers* foram utilizados, permitindo identificar os níveis de transcritos (mRNA) do gene *Eu4* endógeno e do endógeno+transgenes. De acordo com o esperado, em plantas não transformadas, que apresentam apenas o gene endógeno, observa-se o

10 mesmo padrão de expressão para os dois conjuntos de *primers*, validando sua utilização. Mesmo entre cultivares, o nível de expressão não variou (dados não apresentados). Surpreendentemente, a presença de cópias extras de *Eu4* elevou a expressão da urease em apenas uma planta (evento 5C), em níveis moderadamente maiores que na selvagem (2,5X mais). A maior parte das

15 plantas transformadas (eventos A3, A8, 4F e 7E), apresentou uma redução na expressão do transgene, enquanto que duas plantas mantiveram o mesmo nível das plantas selvagens. Entretanto, os níveis de mRNA observados para *Eu4* endógeno de todas as plantas transgênicas foram menores do que os observados em plantas não transgênicas, submetidas às mesmas condições

20 de cultura. O conjunto desses resultados indica que a tentativa de super-

expressar a urease ubíqua em soja induziu a co-supressão da expressão do gene endógeno e, na maior parte das plantas, também do transgene. A presença de um grande número de cópias extras de *Eu4* pode ser uma das explicações do fenótipo co-suprimido.

5 Testes de atividade enzimática da urease comprovaram os resultados de expressão em nível de mRNA. Os dois testes realizados apontam para uma atividade ureásica reduzida, como reflexo de menor acúmulo da enzima, nas plantas transgênicas co-suprimidas do Experimento I.

10 No primeiro teste de atividade ureásica, uma solução indicadora de pH foi utilizada para medir a alcalinidade do meio, determinada pela quantidade de amônia liberada em função da degradação da uréia. A coloração rosada indica a presença de amônia. Nas amostras contendo folhas de plantas transformadas não houve mudança na coloração da solução mesmo após 24 h de incubação. Enquanto que naquelas com folhas não transformadas, uma leve pigmentação avermelhada foi observada após 8h. No controle positivo, 15 contendo sementes que apresentam grande conteúdo de urease, uma forte tonalidade rosa foi atingida após 1 min.

20 No segundo ensaio bioquímico, a atividade ureásica pode ser quantificada e confirmou o resultado do ensaio qualitativo. A atividade enzimática presente nas folhas de plantas não transformadas foi comparada com a de plantas dos eventos A1, A2, A3 e A8. As plantas de todos os eventos de transformação apresentaram atividade ureolítica significativamente menor, inclusive no evento A1, que apresentou níveis totais de mRNA semelhantes aos das plantas selvagens.

25 Mesmo apresentando co-supressão, as plantas obtidas representam um avanço no estudo funcional do gene, uma vez que mutantes nulos para urease ubíqua nunca foram obtidos. Tendo em vista que as ureases são potencialmente multifuncionais, as plantas co-suprimidas representam uma ferramenta importante para determinação das funções adicionais à atividade 30 ureásica.

Análise de segregação na progênie

Foi realizada a análise de segregação dos transgenes na progênie de uma planta por evento obtido a partir do Experimento I (Tabela 3). Os dados observados estão de acordo com o esperado para o padrão de segregação Mendeliana.

5

Tabela 3. Segregação dos transgenes na progênie.

Experimento	Evento T ₀	Número de plantas T ₁ analisadas	Número de plantas T ₁		Razão esperada	P*
			GFP/PCR +	GFP/PCR -		
I	IAS5 A1	20	14	6	3:1	>0,05
I	IAS5 A3	20	11	9	3:1	>0,05
I	IAS5 A8	20	12	8	3:1	>0,05
	IAS5 NT	20	0	20	-	-

*Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico do χ^2 .

Bioensaios

10 Foi realizado um bioensaio *in vitro* para avaliar a atividade antifúngica de plantas transgênicas co-suprimidas e super-expressas. A capacidade de crescimento vegetativo de fungos não patogênicos (*Curvularia lunata*, *Penicillium herguiei*) e patogênicos (*Rhizoctonia solani*, *Phomopsis sp.* e *Fusarium solani*) da soja foi avaliada turbidimetricamente.

15 O extrato protéico bruto das plantas transgênicas, com menores níveis da urease ubíqua, foi menos efetivo na inibição do crescimento dos fungos do que o extrato de plantas não transformadas. Por outro lado, em extrato da planta transgênica, com níveis aumentados da enzima, observou-se um menor

crescimento dos fungos após 60 h, além da ausência de esporos de *C. gossypie* e *P. herguei* mesmo após 10 dias de incubação. Portanto, conclui-se que a falta da urease ubíqua torna as plantas mais susceptíveis, enquanto que um aumento as torna mais resistentes.

5 Um segundo bioensaio com folhas destacadas foi realizado para avaliar a infecção de *P. pachyrizy* em plantas co-suprimidas. O desenvolvimento da doença foi observado tanto em folhas de plantas transformadas quanto nas não transformadas. O tipo de lesão (TAN) também foi o mesmo. Contudo, os valores registrados para todos os quesitos avaliados (número de lesões, de
10 lesões com pústula, de pústulas totais e de pústulas abertas) foram significativamente maiores para folhas de plantas transformadas, com menores níveis de urease ubíqua, do que aqueles observados para folhas de plantas não transformadas. Estes dados mostram que a ausência da urease causa maior suscetibilidade das plantas aos danos causados pela infecção por
15 *P. pachyrhizi*.

Nossos estudos do padrão de expressão do gene *Eu4* mostraram que a urease ubíqua de soja estaria envolvida no mecanismo de resistência à *P. pachyrizy*. Além disso, bioensaios revelaram que plantas transgênicas, com a expressão do gene *Eu4* co-suprimida, são mais susceptíveis a *P. pachyrizy* e a
20 todos os fungos filamentosos testados (*C. gossypie*, *C. lunata*, *P. herguei*, *F. solani*, *Phomosis* sp). Uma única planta transgênica super-expressando a urease ubíqua foi obtida e apresentou maior resistência aos fungos filamentosos. A atividade da urease parece não ser específica a um pequeno grupo de fungos, uma vez que sua presença/ausência afetou tanto a
25 capacidade de infecção por fungos necrotróficos quanto por biotrófico. Os resultados comprovam que esta é uma das proteínas envolvidas no complexo de resistência das plantas e que o aumento de sua expressão por métodos de transformação pode fornecer uma alternativa para a obtenção de plantas de soja, ou outras culturas, mais resistentes a diversos tipos de fungos.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações

CÉLULA TRANSFORMADA, MATERIAL VEGETAL TRANSGÊNICO, MÉTODO DE PROTEÇÃO CELULAR, USO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UREASES

- 5 1. Célula transformada caracterizada por compreender material biológico transgênico capaz de modular a atividade de sequências relacionadas a ureases e/ou seus fragmentos.
2. Célula transformada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por apresentar atividade antifúngica.
- 10 3. Material vegetal transgênico caracterizado por compreender pelo menos um material biológico transgênico capaz de modular a atividade de sequências relacionadas a ureases e/ou seus fragmentos.
4. Material vegetal transgênico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por ser obtido utilizando um vetor biológico compreendendo pelo menos uma sequência nucleotídica capaz de expressar urease e/ou seus fragmentos; e pelo menos um promotor adequado.
- 15 5. Material vegetal transgênico, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por apresentar atividade antifúngica.
6. Método de proteção celular caracterizado por compreender as etapas
- 20 de:
- a) obter material biológico relacionado a ureases e/ou seus fragmentos;
- b) contactar o material de a) com o material biológico do organismo que necessita de proteção.
- 25 7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela modulação da atividade compreender a superexpressão do gene *eu4* e/ou outro gene que codifique urease.
8. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo material biológico do organismo que necessita de proteção ser qualquer parte da soja
- 30 ou outra espécie de planta.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pela proteção celular estar relacionada à atividade antifúngica das ureases.

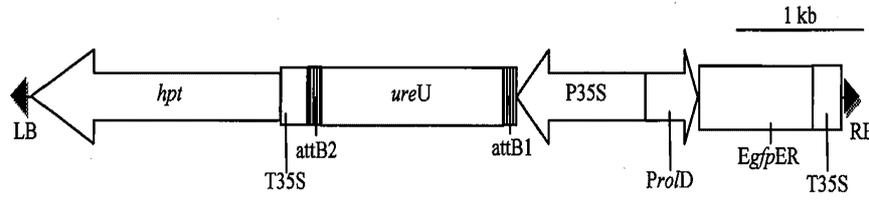
10. Uso de ureases manipuladas geneticamente caracterizadas por serem utilizadas contra fungos.

5 11. Composição agroquímica caracterizada por compreender:

- a) material biológico relacionado a ureases e/ou seus fragmentos;
- b) veículo aceitável.

FIGURAS

Figura 1



Resumo

**CÉLULA TRANSFORMADA, MATERIAL VEGETAL TRANSGÊNICO, MÉTODO DE
PROTEÇÃO CELULAR, USO E COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO UREASES**

- 5 A presente invenção descreve células transformadas compreendendo material transgênico, material vegetal transgênico, métodos de proteção celular, uso e composição compreendendo ureases.