

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2012.06.15	(73) Titular(es): SESVANDERHAVE N.V. INDUSTRIEPARK 15 SOLDATENPLEIN Z2 3300 TIENEN BE
(30) Prioridade(s): 2011.06.23 EP 11171196	
(43) Data de publicação do pedido: 2014.04.30	
(45) Data e BPI da concessão: 2017.08.09 193/2017	(72) Inventor(es): ELODIE KLEIN FR VÉRONIQUE GRAFF FR DAVID GILMER FR VÉRONIQUE BRAULT FR GUY WEYENS BE
	(74) Mandatário: VASCO STILLWELL DE ANDRADE RUA CASTILHO, 165 1070-050 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **CONSTRUÇÕES DE SILENCIAMENTO DE GENES P0 E UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO ESTÁ RELACIONADA COM UMA SEQUÊNCIA DE NUCLEÓTIDOS VIRAL P0 DE BMV RECOMBINANTE QUE QUANDO TRANSCRITA NUMA CÉLULA É CAPAZ DE FORMAR UMA SEQUÊNCIA DE ARN AUTOCOMPLEMENTAR BICATENÁRIO.

RESUMO

CONSTRUÇÕES DE SILENCIAMENTO DE GENES P0 E UTILIZAÇÃO

A presente invenção está relacionada com uma sequência de nucleótidos viral P0 de BMV recombinante que quando transcrita numa célula é capaz de formar uma sequência de ARN autocomplementar bicatenário.

DESCRIÇÃO

CONSTRUÇÕES DE SILENCIAMENTO DE GENES P0 E UTILIZAÇÃO

Campo da invenção

A presente invenção está relacionada com um método para a transmissão de resistência ou tolerância viral a um ou mais vírus, em particular ao vírus do amarelecimento suave da beterraba (BMV) e ao vírus da veia amarela necrótica da beterraba (BNYVV) ou ao BMV sozinho numa planta, em particular numa planta de beterraba. Além disso, a presente invenção relaciona-se com a planta resistente ou tolerante ao vírus obtida de acordo com este método, bem como com sementes e descendência derivada das mesmas.

A presente invenção relaciona-se igualmente a construções de silenciamento de genes, especialmente construções em gancho que medeiam silenciamento de ARN BMV ou BMV e BNYVV e respetiva utilização.

Antecedentes da invenção

Os vírus de plantas são um problema grave para muitas das principais culturas agrícolas, uma vez que as infeções por vírus provocam grandes perdas de colheita.

Na beterraba, as principais causas de doença são: (i) amarelecimento causado por um polerovírus, o Vírus do amarelecimento suave da beterraba (BMV) transmitido pelo respetivo vetor principal *Myzus persicae* de uma maneira persistente; (ii) rizomania da beterraba causada por um benyvírus, o Vírus da veia amarela necrótica da beterraba (BNYVV) transmitido por *Polymyxa betae*. A utilização extensiva de resistente contra BNYVV permitiu preservar produções, apesar de estarem a ocorrer isolados virais de quebra de resistência e de existir uma necessidade urgente de novas variedades resistentes.

Os vírus transmitidos por fungos, tal como BNYVV, podem ser retidos em esporos de repouso no solo durante

anos depois de um campo ficar infestado. Uma vez que não existem nenhuns métodos químicos ou físicos eficazes para a eliminação do vírus, nem nas plantas nem no solo, a única opção para o produtor de beterraba é a utilização de cultivares geneticamente resistentes. Várias empresas forneceram diversas variedades tolerantes e mesmo parcialmente resistentes através de reprodução. Contudo, trata-se de um processo muito tedioso e moroso, que demora geralmente muito tempo até serem obtidas plantas resistentes úteis.

A rápida revolução nas áreas de engenharia industrial originou o desenvolvimento de novas estratégias para conferir a resistência genética aos vírus. A resistência a doenças virais através da introdução de porções de sequências de genomas virais em que a sequência (construção) viral é transformada numa célula de planta e numa planta tornou-se uma nova fonte de resistência.

A beterraba é conhecida por ser uma espécie recalcitrante na engenharia genética, complicando uma possível indução bem-sucedida de resistência viral.

Alguns exemplos de tolerância de engenharia, por exemplo para o BNYVV transformando e expressando a sequência de proteínas de revestimento BNYVV no genoma de beterraba, foram publicados (W091/13159), embora existam apenas dados de relatório raros sobre as plantas de beterraba transgênicas funcionais completas, tais como as divulgadas em EP 1 169 463 B1. Em particular, os relatórios mostram dados limitados sobre o nível de resistência observada nas condições infetadas com plantas de beterraba transgênicas transformadas com um gene que codifica uma sequência de proteínas de revestimento BNYVV.

O genoma do furovírus da veia amarela necrótica da beterraba (BNYVV) consiste em cinco ARNs *plus-sense*, dois dos quais (ARNs 1 e 2) codificam funções essenciais para a infecção de todas as plantas enquanto os outros três (ARNs

3, 4 e 5) são implicados na infecção mediada por vetor de raízes de beterraba (*Beta vulgaris*). O movimento de célula-para-célula de BNYVV é gerido por um conjunto de três genes virais sucessivos e ligeiramente sobrepostos no ARN 2 conhecido como o bloco triplo de genes (TGB), que codifica, por ordem, as proteínas virais P42, P13 e P15 (os produtos de gene são designados pelo respetivo Mr calculado em quilodaltons).

O genoma de BMV consiste num ARN *plus-sense* linear com seis grelhas de leitura abertas (ORFs 0 a 5) principais. As ORFs 1 e 2 codificam proteínas envolvidas na replicação de vírus, enquanto cada uma das outras três ORFs (ORFs 3, 4 e 5) é codificada relativamente a proteínas estruturais (proteínas de revestimento maiores e menores) e uma proteína de movimento putativo.

Foi mostrado que a proteína P0 de BMV tem uma expressão fraca, uma consequência de contexto de codões de iniciação desfavorável do P0 AUG e uma forte tendência para manter uma baixa expressão. Além disso, esta parte do genoma é altamente variável, e esta diversidade de sequência foi explorada para discriminar as diferentes espécies.

As doenças causadas por BNYVV mostram expandir-se geograficamente a uma velocidade que depende da combinação de numerosos fatores ambientais e agrícolas locais. Por conseguinte, existe uma necessidade de melhorar os mecanismos de resistência genética que podem, sozinhos ou em conjunto, conferir uma resistência estável e de longa duração de plantas de beterraba que são cultivadas para utilização industrial.

Estado da técnica

O pedido de patente WO 2007/128755 divulga uma sequência TGB-3 utilizada para reduzir e/ou suprimir os efeitos deletérios de TGB-3 de tipo selvagem nas plantas, para gerar plantas transgênicas resistentes ao vírus,

especialmente beterrabas resistentes ao Vírus da veia amarela necrótica da beterraba.

Carmen Simon-Mateo *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809 N.º 11 e 12, páginas 722 a 731, 2011, divulga diferentes estratégias antivirais utilizadas para obter plantas resistentes virais nos últimos 25 anos.

A. Kozłowska-Makulska *et al.*, *Journal of General Virology* Vol. 91, N.º 4, páginas 1082 a 1091, 2010, divulga a atividade supressora de silenciamento de ARN de proteínas P0 de diferentes isolados dos polerovírus de beterraba infetada, vírus da clorose da beterraba e vírus do amarelecimento suave da beterraba.

Pu Yan *et al.* *Journal of Virological Methods* Vol. 166, N.º 1 e 2, páginas 101 a 105, 2010, divulga construções de silenciamento de ARN para desenvolver plantas resistentes ao vírus através da expressão de ARNs em gancho derivados de vírus.

Sumário da invenção

A presente invenção fornece métodos e meios para conferir tolerância ou resistência viral que não apresentem as desvantagens do estado da técnica, preferencialmente métodos e meios que conferem tolerância, resistência, preferencialmente resistência extrema ou total, especialmente tolerância ou resistência viral a BMV (Vírus do amarelecimento suave da beterraba) (incluindo resistência extrema ou total a BMV) ou preferencialmente tolerância ou resistência a BMV (Vírus do amarelecimento suave da beterraba) e BNYVV (Vírus da veia amarela necrótica da beterraba) combinados (incluindo resistência extrema ou total a BMV e BNYVV) numa célula de planta ou numa planta, em particular numa célula de planta de beterraba ou numa planta de beterraba (possivelmente gerada a partir desta célula de planta).

A presente invenção fornece ainda células de planta geneticamente modificadas ou transformadas que podem ser

obtidas como tal, ou obtidas a partir deste método, e que podem ser geradas nas plantas que apresentam esta maior tolerância ou resistência aos vírus de planta mencionados.

A invenção fornece igualmente descendência, isto é, descendência resistente ao vírus ou tolerante ao vírus, sementes ou outros órgãos reproduzíveis ou estruturas originárias desta planta ou destas células de plantas transformadas.

Um primeiro aspeto da presente invenção é uma construção de ARN compreendendo uma sequência de segmento *sense* e uma sequência de segmento *antisense* que têm sequências deduzidas a partir do gene P0 (ou a partir da proteína B0 de codificação de genes) do genoma BMYV ou a partir de um gene ortólogo, em que a referida sequência de segmento *sense* e a referida sequência de segmento *antisense* compreendem ambas um fragmento de nucleótido com a sequência que partilha pelo menos 85 % de identidade de sequência com o gene P0 do genoma BMYV ou de um gene ortólogo.

Preferencialmente, nesta construção de ARN, a(s) sequência(s) de segmentos *sense* e/ou segmentos *antisense* compreende(m) ainda um fragmento de nucleótido com a(s) sequência(s) que partilha(m) pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência não traduzida de extremidade 5' (UTR 5') adjacente à sequência de nucleótidos de gene P0.

Mais preferencialmente nesta construção de ARN, as sequências de segmentos *sense* e segmentos *antisense* compreendem um fragmento de nucleótido com sequências que partilham pelo menos 85 % de identidade de sequência com o gene P0 do genoma BMYV.

Vantajosamente, nesta construção de ARN, as sequências de segmentos *sense* e segmentos *antisense* compreendem ainda um fragmento de nucleótidos com sequências que partilham pelo menos 85 % de identidade de sequência com o gene P1 do

genoma BMYV.

Possivelmente, nestas construções de ARN, o segmento *sense* compreende ou consiste na sequência SEQ.ID.NO:1 e/ou o segmento *antisense* compreende ou consiste na sequência SEQ.ID.NO:3.

Vantajosamente, nestas construções de ARN, as sequências de segmentos *sense* e segmentos *antisense* compreendem ambas ainda um fragmento de nucleótido que partilha pelo menos 85 % de identidade de sequência com o genoma BNYVV.

Um aspeto relacionado da presente invenção é uma construção de ADN que pode ser transcrita nesta(s) construção(ões) de ARN.

Outro aspeto relacionado é um vetor compreendendo a sequência de nucleótidos destas construções de ácido nucleico (ADN).

Outro aspeto relacionado é uma molécula de ARN autocomplementar bicatenário expressada por este vetor ou esta construção de ADN.

A presente invenção relaciona-se igualmente com um método para a indução de tolerância ou resistência, preferencialmente resistência total pelo menos ao vírus BMYV e possivelmente outro vírus, numa planta ou numa célula de planta, o referido método compreendendo as etapas de: preparação da construção de ácido nucleico da presente invenção (p. ex. compreendendo uma sequência deduzida a partir do gene P0 e/ou do genoma BMYV), ligada de modo funcional a uma ou mais sequências reguladoras ativas na planta ou na célula de planta, e a transformação da célula de planta com a construção de ácido nucleico, induzindo assim a resistência pelo menos ao vírus BMYV na planta ou na célula de planta.

Vantajosamente, este método induz ainda tolerância a outro vírus, que é selecionado a partir do grupo que consiste em Vírus do mosaico amarelo do nabo, Vírus do

amarelo transmitido pelo pulgão da cúrcuma, Vírus do enrolamento da folha da batata, Vírus da folha amarela da cana-de-açúcar, Vírus do Mosaico da Enação da Ervilha, Vírus do amarelo da beterraba ocidental-E.U.A., Vírus da clorose da beterraba, Vírus do nanismo amarelo do cereal e vírus BNYVV, preferencialmente o vírus BNYVV.

Um aspeto relacionado é um método para a indução de tolerância pelo menos ao vírus BMYV compreendendo a etapa de preparação de uma construção de ácido nucleico compreendendo um segmento *sense* e um segmento *antisense* deduzidos a partir da sequência de nucleótidos BNYVV, sendo preferencialmente deduzidos a partir do gene que codifica a proteína P15 do referido BNYVV.

Ainda um aspeto relacionado é a utilização de uma sequência de nucleótidos compreendendo uma sequência deduzida a partir do gene P0 e/ou do genoma BMYV e/ou do ARN, ADN ou vetor da presente invenção para a indução de tolerância ou resistência, preferencialmente resistência total ao vírus BMYV e/ou ao vírus BNYVV, numa planta ou numa célula de planta.

Outro aspeto é uma planta transgénica ou uma célula de planta transgénica tolerante ou resistente, de preferência totalmente resistente pelo menos ao vírus BMYV e possivelmente a um ou mais outros vírus e compreendendo uma construção de ácido nucleico capaz de expressar a sequência de nucleótidos da presente invenção (compreendendo uma sequência deduzida a partir do gene P0 e/ou do genoma BMYV), ligada de modo funcional a uma ou mais sequências reguladoras ativas na planta ou na célula de planta, compreendendo o vetor da presente invenção, ou compreendendo uma molécula de ARN autocomplementar bicatenário da presente invenção.

Preferencialmente, esta planta transgénica ou célula de planta transgénica é resistente a outro vírus, que é selecionado a partir do grupo que consiste em Vírus do

mosaico amarelo do nabo, Vírus do amarelo transmitido pelo pulgão da cúrcuma, Vírus do enrolamento da folha da batata, Vírus da folha amarela da cana-de-açúcar, Vírus do Mosaico da Enação da Ervilha, Vírus do amarelo da beterraba ocidental-E.U.A., Vírus da clorose da beterraba, Vírus do nanismo amarelo do cereal e vírus BNYVV, preferencialmente o vírus BNYVV.

Preferencialmente, esta planta transgênica ou célula de planta transgênica é selecionada a partir do grupo que consiste em alface, pepino, batata, cana-de-açúcar, ervilha, cevada e beterraba, sendo preferencialmente uma beterraba ou uma célula de beterraba.

Um aspeto relacionado é um tecido de planta transgênica e/ou uma estrutura reproduzível derivada a partir desta célula de planta transgênica (de acordo com a presente invenção), em que o referido tecido é selecionado a partir do grupo que consiste em fruto, caule, raiz, tubérculo e semente, ou em que a referida estrutura reproduzível é selecionada a partir do grupo que consiste em calos, rebentos ou embriões.

Breve descrição das figuras

As Figuras 1A e B representam um fragmento da sequência de P0 viral de acordo com a invenção (Figuras 1A e B; SEQ.ID.NO:13) com uma sequência de nucleótidos P0 *sense* (SEQ.ID.NO:1, mais curta do que a sequência de P0 completa SEQ ID NO: 17) e uma sequência de nucleótidos P0 *antisense* homóloga correspondente (**negrito**, SEQ.ID.NO:3) intercalada com uma sequência de intrões de petúnia de 1352 bp (**negrito sublinhado**, SEQ.ID.NO:11). Alguns nucleótidos na Figura 1B são indicados em **negrito itálico**. Estes correspondem à UTR 5' do genoma BMYV viral. Outros poucos nucleótidos em **itálico e sublinhados** na Figura 1B não pertencem a P0 nem ao intrão, mas ainda se encontram presentes, uma vez que estes correspondem aos restos da estratégia de clonagem. Uma construção

compreendendo o gancho completo (SEQ.ID.NO:13) é igualmente referida como construção hpP0 1.

A Figura 2 (A e B) representa outro fragmento da sequência de P0 viral de acordo com a invenção (Figuras 2A e B; SEQ.ID.NO:14) com uma sequência de nucleótidos P0 *sense* e uma sequência de nucleótidos P0 *antisense* (negrito) intercalada com uma sequência de intrões de beterraba de 91 bp (negrito sublinhado, SEQ.ID.NO:12). Alguns nucleótidos na Figura 2B são indicados em negrito itálico. Estes correspondem à UTR 5' do genoma BMV viral. Outros poucos nucleótidos em itálico e sublinhados na Figura 2B que não pertencem a P0 nem pertencem ao intrão ainda se encontram presentes, uma vez que estes correspondem aos restos da estratégia de clonagem. As sequências de nucleótidos P0 *sense* e *antisense* aqui são iguais às apresentadas na Figura 1B. Uma construção compreendendo o gancho completo (SEQ.ID.NO:14) é igualmente referida como construção hpP0 2.

A Figura 3 realça as diferenças na extremidade 5' da SEQ.ID.NO:1 em comparação com a extremidade 5' da sequência de codificação BMV P0 representada por SEQ ID NO: 17. A sequência sublinhada da Fig. 3 corresponde à sequência líder 5' não funcional da SEQ.ID.NO:1.

A Figura 4 (A e B) é uma representação esquemática do vetor pFGC5941 no qual um fragmento do gene P0 foi introduzido na orientação *sense* (SEQ.ID. NO:1) e *antisense* (SEQ.ID. NO:3), intercalado por uma sequência intrónica do gene Chalcona Sintase A de petúnia (CHSA; SEQ.ID. NO:11) (Figura 4A, pFGC5941, construção 1; SEQ.ID. NO:13), ou intercalado por uma sequência intrónica de beterraba (SEQ.ID. NO:12) de 91 nt (Figura 4B, pFGC5941, construção 2; SEQ.ID. NO:14). Promotor CaMV 35S: promotor 35S de CaMV; 3' OCS: sinal de poliadenilação do gene octopina sintase; promotor MAS: promotor do gene manopina sintase; 3' MAS: sinal de

poliadenilação do gene monopina sintase; BAR: gene de resistência ao herbicida Basta; pVS1: origem de replicação de pVS1; NPTII: gene de resistência a canamicina; LB, RB: bordas T-ADN esquerda e direita.

A Figura 5 é uma análise estatística do teste de resistência obtido com a construção 1 (hpP0u com o intrão de petúnia). Cada histograma representa o título BMV médio com erro padrão em 10 plantas inoculadas com BMV (Y). hp: gancho; Inf: infetado. No eixo Y: densidade ótica (A_{405}) obtida por ELISA 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,2. No eixo X, da esquerda para a direita: linhas transgênicas: hpP0-7, hpP0-8, hpP0-9, hpP0-10, hpP0-11 e hpP0-12; controlo infetado por BMV: Col0 Inf; Col0 saudável.

A Figura 6 é uma análise estatística do teste de resistência obtido com a construção 2 (hpP0u com o intrão de beterraba). Cada histograma representa o título BMV médio com erro padrão em 10 plantas inoculadas com BMV (Y). hp: gancho; hpP0: construção 1; hpP0beterraba: construção 2; Inf: infetado. No eixo Y: densidade ótica (A_{405}) obtida por ELISA 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3. No eixo X, da esquerda para a direita: linhas transgênicas: hpP0-12 (construção 1), hpP0beterraba-1 (construção 2), hpP0beterraba-2, hpP0beterraba-3, hpP0beterraba-4, hpP0beterraba-5, hpP0beterraba-6, hpP0beterraba-7 e hpP0beterraba-8; controlo infetado por BMV: Col0 Inf; Col0 saudável.

A Figura 7 é uma análise estatística do teste de resistência obtido com as construções 1 e 2 respetivamente. Cada histograma representa o título de vírus médio com erro padrão em 10 plantas inoculadas (Y). Os histogramas com cor cinzento escuro representam a infeção por clone BMV-EK e os histogramas com cinzento claro a infeção por isolado BMV-2itb através do método de transmissão de pulgões, respetivamente. hp: gancho;

hpP0: construção 1; hpP0beterraba: construção 2; Inf: infetado. No eixo Y: densidade ótica (A_{405}) obtida por ELISA 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5. No eixo X, da esquerda para a direita: linhas transgênicas: hpP0-9 (construção 1), hpP0-10, hpP0-12, hpP0beterraba-2 (construção 2), hpP0beterraba-7 e hpP0beterraba-8; controlo infetado: Col0 Inf; Col0 saudável.

A Figura 8 representa a sequência P0 WT (SEQ.ID.NO:17 e 18).

A Figura 9 (A e B) representa a sequência da construção em gancho hpP15A4-P0 de acordo com a invenção (Figuras 9A e B, SEQ.ID.NO:15) com uma sequência de nucleótidos P15A4-P0 *sense* (SEQ.ID.NO:7, nucleótidos em itálico para a sequência de P15A4 com as 3 mutações sublinhadas e nucleótidos habituais para a sequência de P0; em comparação com WT P15: A é substituído por C, e AG por GC.) e SEQ.ID.NO:8 que corresponde a uma sequência de nucleótidos P15A4-P0 *antisense* (negrito itálico para P15A4 e negrito para P0) intercalada com uma sequência de intrões de beterraba de 91bp (negrito sublinhado, SEQ.ID.NO:12). Alguns nucleótidos na Figura 9B são indicados em negrito itálico e sublinhado. Estes correspondem à UTR 5' do genoma BMV viral. Outros poucos nucleótidos sublinhados na Figura 9B que não pertencem a P15A4-P0 nem pertencem ao intrão ainda se encontram presentes, uma vez que estes correspondem aos restos da estratégia de clonagem. Uma construção compreendendo o gancho completo (SEQ.ID.NO:15) é igualmente referida como construção hpP15A4-P0 1.

A Figura 10 (A e B) representa a sequência das construções em gancho hpP0-P15A4-A e hpP0-P15A4-B de acordo com a invenção (Figuras 10A e B, SEQ.ID.NO:16) com uma sequência de nucleótidos P0-P15A4 *sense* (SEQ.ID.NO:9, nucleótidos habituais para a sequência P0 e nucleótidos em itálico para a sequência de P15A4 com as 3 mutações

sublinhadas) e SEQ.ID.NO:10 que corresponde a uma sequência de nucleótidos P0-P15A4 *antisense* (negrito para P0 e negrito itálico para P15A4) intercalada com uma sequência de intrões de beterraba de 91bp (negrito sublinhado, SEQ.ID.NO:12). A diferença entre as duas construções em gancho é a presença de dois nucleótidos adicionais na sequência de P15A4 (nucleótidos em caixa) para a construção hpP0-P15A4-B. Alguns nucleótidos na Figura 10B são indicados em negrito itálico e sublinhados. Estes correspondem à UTR 5' do genoma BMV viral. Outros poucos nucleótidos sublinhados na Figura 10B que não pertencem a P0-P15A4 nem pertencem ao intrão ainda se encontram presentes, uma vez que estes correspondem aos restos da estratégia de clonagem. Uma construção compreendendo o gancho completo (SEQ.ID.NO:16) é igualmente referida como construção hpP0-P15A4-A 2 e como construção hpP0-P15A4-B 3.

A Figura 11 (A e B) é uma representação esquemática do vetor pFGC5941 no qual uma sequência de P15A4-P0 ou sequência de P0-P15A4 foi introduzida na orientação *sense* e *antisense*, intercalada por uma sequência intrônica de beterraba de 91 nt (Figura 11A, pFGChpP15A4-P0, construção 1 e Figura 11B, pFGChpP0-P15A4-A e pFGChpP0-P15A4-B, construção 2 e 3, respetivamente). Promotor CaMV 35S: promotor 35S de CaMV; 3' OCS: sinal de poliadenilação do gene octopina sintase; promotor MAS: promotor do gene manopina sintase; 3' MAS: sinal de poliadenilação do gene monopina sintase; BAR: gene de resistência ao herbicida Basta; pVS1: origem de replicação de pVS1; NPTII: gene de resistência a canamicina; LB, RB: bordas T-ADN esquerda e direita.

Descrição detalhada da invenção

Considerando a ocorrência de ambos os vírus dentro das áreas de crescimento de beterraba, os inventores desenvolveram planas transgênicas que são resistentes

relativamente a um ou ambos os vírus (BMV e/ou BNYVV), ou mesmo vírus adicionais capazes de infectar a mesma planta.

Na realidade, BNYVV é uma grande preocupação e os inventores preveem que a prevalência de BMV também corre o risco de crescer.

Um primeiro aspecto da presente invenção está relacionado com uma construção de ARN (tal como um ARN em gancho preferencialmente descrito em seguida como hpP0) compreendendo segmento *sense* (ARN) e segmento *antisense* (ARN) (ambos) tendo sequências deduzidas (isto é, que partilham pelo menos 85 % de identidade de sequência) a partir do gene P0 (ou sequência de nucleótidos) ou a partir do gene (sequência de nucleótidos que codifica a proteína B0) do genoma BMV ou a partir de genes ortólogos ou que têm sequências deduzidas (isto é, que partilham pelo menos 85 % de identidade de sequência) a partir do genoma BMV.

Vantajosamente, esta construção de ARN (gancho; hpP0) compreende um segmento *sense* (ARN) e um segmento *antisense* (ARN) (ambos) compreendendo ainda fragmentos (*sense* e/ou *antisense*) (ARN) deduzidos (isto é, que partilham pelo menos 85 % de identidade) a partir da região não traduzida 5' (UTR 5') de BMV (adjacente a este gene que codifica P0 de BMV ou genes ortólogos) e/ou esta construção de ARN (gancho) compreende um segmento ARN *sense* e um segmento ARN *antisense* com sequências deduzidas a partir de um fragmento de nucleótidos da UTR 5' e de um fragmento de nucleótido (adjacente) da sequência de nucleótidos P0 de BMV ou de genes ortólogos.

Preferencialmente, estes fragmentos da UTR 5' e da sequência de nucleótidos P0 são adjacentes no genoma BMV.

Este gancho ARN, ao compreender um fragmento da UTR 5' e de P0, é preferencialmente referido na presente invenção como sequência de nucleótidos hpP0u.

Possivelmente (mas menos preferencialmente), esta(s) construção(ões) (gancho(s) hpP0 e/ou hpP0u (ARN)) de acordo

com a invenção não compreende(m) um fragmento que tem uma sequência deduzida a partir de outro vírus, tal como genoma BNYVV.

Vantajosamente, esta(s) construção(ões) de ARN (gancho; hpP0 e/ou hpP0u) de acordo com a invenção compreende(m) um segmento de ARN *sense* e um segmento de ARN *antisense* tendo ainda (um fragmento sendo) sequências deduzidas a partir do genoma BNYVV, preferencialmente além da sequência 5' UTR a partir do genoma BMYV (adjacente a P0) e/ou esta(s) construção(ões) de ARN (gancho; hpP0 e/ou hpP0u) compreende(m) um segmento de ARN *sense* e um segmento de ARN *antisense* (compreendendo um fragmento tendo uma sequência deduzida a partir do gene P0) ambos compreendendo ainda um fragmento de nucleótido que partilha pelo menos 85 % de identidade de sequência com (uma parte de) o genoma BNYVV.

Mais preferencialmente, estes segmentos de ARN *sense* e *antisense* deduzidos a partir do genoma BNYVV são sequências *sense* e/ou *antisense* que correspondem à (uma parte da) sequência P15 do genoma BNYVV (quando o mesmo corresponde a um gancho, são aqui abaixo referidos como hpP0-P15 ou hpP0u-P15, o último contendo ainda um fragmento de nucleótido deduzido a partir da sequência UTR 5' do genoma BMYV).

Vantajosamente, esta(s) construção(ões) (em gancho) de ARN hpP0 e/ou hpP0u compreende(m) igualmente fragmentos (ARN) de nucleótidos *sense* e *antisense* com sequências deduzidas a partir da sequência de nucleótidos P1 de BMYV.

No contexto da presente invenção, "ortólogos" referem-se a genes em espécies diferentes que retêm a mesma função (p. ex. no decorrer da evolução). Um exemplo de genes ortólogos do gene P0 (ou sequência de nucleótidos) do genoma BMYV é fornecido na tabela 1.

Tabela 1: lista não exaustiva de ortólogos de sequência de P0 identificados

Vírus	Tamanho de P0	Hospedeiro
Vírus do mosaico amarelo do nabo (anteriormente BWYV-FL1)	27,5 kDa	alface
Vírus do amarelo transmitido pelo pulgão da cúrcuma	26,4 kDa	pepino
Vírus do enrolamento da folha da batata	27,2 kDa	batata
Vírus da folha amarela da cana-de-açúcar	28,3 kDa	cana-de-açúcar
Vírus do Mosaico da Enação da Ervilha	34 kDa	ervilha
Vírus do amarelo da beterraba ocidental-E.U.A.	26,3 kDa	beterraba
Vírus da clorose da beterraba	27,4 kDa	beterraba
Vírus do nanismo amarelo do cereal	28,3 kDa	cevada

No contexto da presente invenção, o termo "segmento" refere-se a uma ou mais sequências de nucleótidos (ARN) *sense* e/ou *antisense* que podem ser utilizadas no silenciamento de genes. Um segmento pode, por conseguinte, ter um comprimento de, no mínimo, 10 (preferencialmente pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 ou 40) nucleótidos, mas pode igualmente estender-se por diversos genes e/ou genes e regiões não traduzidas (5') (UTR 5') adjacentes. O segmento preferido estende-se pelo (pela parte 5' do) gene P0 (ou sequência de nucleótidos) e pela UTR 5' adjacente.

No contexto da presente invenção, o termo "fragmento" refere-se a uma sequência de nucleótidos (ARN) *sense* e/ou sequência de nucleótidos *antisense* com uma sequência deduzida a partir de uma sequência de nucleótidos virais

alvo. Um fragmento pode, por conseguinte, ter um comprimento de, no mínimo, 10 (preferencialmente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35 ou 40) nucleótidos, mas pode igualmente estender-se por mais de um gene.

No contexto da presente invenção, possivelmente, diversos fragmentos são associados para formar um ou mais segmentos *sense* e/ou *antisense* (ARN).

Possivelmente (especialmente no caso de dois fragmentos deduzidos a partir do genoma de diferentes vírus serem associados), os fragmentos são associados através de uma sequência de ligantes ou espaçadores (não derivados da sequência viral alvo) para formar um segmento *sense* (ARN) e/ou um ou mais segmentos *antisense* (ARN).

Preferencialmente, na presente invenção, o fragmento UTR 5' e o fragmento P0 adjacente estão associados sem uma sequência de ligantes ou espaçadores.

Estas construções podem compreender sequências modificadas (sequências mutantes).

Por conseguinte, o termo "sequência deduzida" refere-se a sequências de nucleótidos com pelo menos 85 % (mais preferencialmente, pelo menos 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ou até 100 %) de identidade de sequência com o gene mencionado. Por exemplo, uma sequência deduzida a partir do gene P0 (ou sequência) do genoma BMV refere-se preferencialmente a uma sequência de nucleótidos com pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência SEQ.ID.NO:17.

Preferencialmente, estas construções não contêm mais de 15 % de resíduos mutantes em comparação com a sequência de tipo selvagem (SEQ.ID.NO:17) e/ou com a sequência SEQ.ID.NO:1 ou a sequência SEQ.ID.NO:3.

Vantajosamente, estas construções (ARN) (incluindo segmentos e, mais preferencialmente, fragmentos) têm um tamanho superior a cerca de 25 nucleótidos, preferencialmente superior a cerca 50 nucleótidos.

Possivelmente, estas construções (ARN) (na forma de segmento *sense* e/ou de segmento *antisense*) têm um tamanho inferior a cerca de 10 000 nucleótidos, possivelmente inferior a cerca de 5000, cerca de 3000, cerca de 2000 ou cerca de 1000 nucleótidos.

Preferencialmente, o segmento *sense* (ARN) e/ou o segmento *antisense* (ARN) (com sequência deduzida a partir da UTR 5' de P0) compreendem fragmento(s) que se estende(m) por pelo menos 5 nucleótidos, mais preferencialmente pelo menos 10 nucleótidos, ainda mais preferencialmente pelo menos 20 nucleótidos da UTR 5' (adjacente ao gene P0), mas possivelmente por menos de 40 nucleótidos e preferencialmente por menos de 30 nucleótidos desta UTR 5' (adjacente ao gene P0).

A caracterização molecular do material de planta demonstrou a presença de pequenas moléculas de ARN complementares tanto a *sense* como a *antisense* da sequência de P0 BMYV, indicando que o mecanismo de silenciamento foi obtido e acionou a degradação do ARN genômico.

Estas construções (em gancho) de ARN acionam eficientemente PTGS, visando a degradação do ARN transcrito de BMYV (ou de BMYV e BNYVV).

Os inventores encontraram na realidade uma inibição mais potente de BMYV (e de BNYVV) através das construções que albergam uma UTR 5' de BMYV, além de P0 (possivelmente além de sequências (fragmentos) deduzidas a partir do genoma BNYVV).

Por exemplo, ao utilizar a construção de nucleótidos hpP0-P15, os inventores observaram a produção de pARNis que visam a sequência BMYV, mas igualmente a sequência de ARN2 BNYVV, resultando numa inibição muito eficaz e inesperada de ambas as infecções virais.

No caso desta construção dupla, os inventores observaram uma redução mais marcada de ambas as infecções virais (BMYV e/ou BNYVV) do que se for utilizada uma

construção comparável que visa exclusivamente BNYVV ou BMVYV.

Um aspecto relacionado é uma construção de ARN (tal como um ARN em gancho) compreendendo um segmento (ARN) *sense* e um segmento (ARN) *antisense* (ambos) tendo sequências deduzidas (isto é, que partilham pelo menos 85 % de identidade de sequência) a partir do genoma BMVYV (ou a sequência de nucleótidos do mesmo).

Preferencialmente, a construção de ARN (tal como um ARN em gancho) deduzida a partir do genoma BMVYV compreendendo um segmento (ARN) *sense* e um segmento (ARN) *antisense* tem uma sequência *sense* deduzida (isto é, que partilha pelo menos 85 % de identidade de sequência) a partir da metade 5' do genoma BMVYV e/ou forma o grupo que consiste em nucleótidos do genoma BMVYV que codifica proteínas P0, P1, P2, P3, P4 e P5, mais preferencialmente a partir dos nucleótidos do genoma BMVYV que codifica proteínas P1 ou P2.

Vantajosamente, estas construções (ARN) deduzidas a partir do genoma BMVYV (incluindo segmentos e, mais preferencialmente, fragmentos) têm um tamanho superior a cerca de 25 nucleótidos, preferencialmente superior a cerca 50 nucleótidos.

Possivelmente, estas construções (ARN) deduzidas a partir do genoma BMVYV (na forma de segmento *sense* e/ou de segmento *antisense*) têm um tamanho inferior a cerca de 10 000 nucleótidos, possivelmente inferior a cerca de 5000, cerca de 3000, cerca de 2000 ou cerca de 1000 nucleótidos.

Contrariamente, os inventores testaram o efeito de construções ARN (na forma de ganchos) com uma sequência deduzida exclusivamente a partir do genoma BNYVV (tal como a sequência que codifica a proteína P15) ou a partir do genoma BMVYV.

Estas construções P15 em gancho deduzidas a partir de BNYVV resultaram numa infeção por BNYVV reduzida em plantas

coinfetadas por ambos os vírus (em comparação com construções de controlo), mas induziram igualmente alguma redução de sintomas BMYV (em comparação com as construções de controlo).

Estas construções hpP0 em gancho e especialmente hpP0u deduzidas a partir de BMYV resultaram numa infeção por BMYV reduzida em plantas coinfetadas por ambos os vírus (em comparação com construções de controlo), mas induziram igualmente a redução dos sintomas devido à infeção por BNYVV (em comparação com as construções de controlo).

Duas sequências de nucleótidos BMYV foram testadas como construção de nucleótidos hpP0u (sequência SEQ.ID.NO:13 ou 14).

A sequência de nucleótidos de SEQ.ID.NO:1, 13 ou 14 pode ser comparada com a sequência SEQ.ID.NO:17, que corresponde à sequência do nucleótido P0 de tipo selvagem (consulte a Figura 8). O comprimento da sequência SEQ.ID.NO:1 é mais curto do que a sequência de nucleótidos da sequência SEQ.ID.NO:17 (659 nt versus 720 nt) e contém a UTR 5' do genoma viral (nucleótidos sublinhados) exceto o primeiro nucleótido de extremidade 5'.

Vantajosamente, a sequência de nucleótidos P0 *sense* e *antisense* são compreendidas numa molécula, e/ou o segmento de ARN P0 *sense* e o segmento de ARN P0 *antisense* são compreendidos numa única molécula de ARN. Vantajosamente, a molécula de ARN de acordo com a invenção é capaz de dobramento, de modo a que os referidos segmentos de ARN aí compreendidos formem uma molécula de ARN em gancho bicatenário.

Conforme aqui utilizado, "ARN em gancho" refere-se a qualquer molécula de ARN bicatenário de autorrecozimento. Na respetiva representação mais simples, um ARN em gancho consiste num caule bicatenário constituído pelas cadeias de ARN de recozimento, ligadas a um único ciclo de ARN monocatenário. Contudo, o termo "ARN em gancho" pretende

igualmente abranger estruturas de ARN secundárias mais complicadas compreendendo sequências de ARN bicatenário de autorrecozimento, mas igualmente ciclos e bojos internos. A estrutura secundária específica adaptada será determinada pela energia livre da molécula de ARN, e pode ser prevista para diferentes situações utilizando *software* apropriado, tal como FOLDRNA.

Em alternativa, as sequências de nucleótidos P0 *sense* e *antisense* podem estar presentes (ou codificadas) em duas moléculas separadas ou sequências de nucleótidos, que podem ser administradas ou fornecidas a uma célula de planta em simultâneo e/ou consecutivamente, de modo a que, quando transcritas, uma molécula de ARN bicatenário possa ser formada por emparelhamento de bases.

A presente invenção está igualmente relacionada com uma construção de ADN que pode ser transcrita na(s) construção(ões) de ARN da invenção e com um vetor compreendendo esta construção de ADN, em particular um vetor de expressão (e/ou vetor de autorreplacação (tal como um plasmídeo ou um vetor viral)) ou cassete de expressão (ou sistema), preferencialmente codificando um segmento de ARN *sense* e um segmento de ARN *antisense* com sequências deduzidas a partir da(s) sequência(s) de P0, ligada(s) de modo funcional a uma ou mais sequências reguladoras (sequência promotora ou operadora, incluindo uma sequência de poliA), ativas numa planta ou célula de planta, preferencialmente num tecido específico (preferencialmente a raiz) da planta.

Outro aspeto da presente invenção relaciona-se com uma célula de planta ou planta transgénica, tal como *Arabidopsis thaliana* ou planta de beterraba (*Beta vulgaris*) que é transformada com a construção de nucleótidos (ADN), o vetor e/ou a molécula de ARN de acordo com a invenção.

Vantajosamente, existe uma baixa, e até nenhuma, amplificação viral na planta inoculada transformada com

o(s) fragmento(s) da(s) sequência(s) de nucleótidos P0 de acordo com a invenção.

Preferencialmente, as sequências de ADN de acordo com a invenção são estavelmente integradas no genoma da célula de planta sendo transformada com as sequências virais P0 geneticamente modificadas de acordo com a invenção e/ou com um vetor compreendendo estas sequências.

Em alternativa, o transgene compreendendo uma sequência de nucleótidos P0 geneticamente modificada de acordo com a presente invenção pode ser localizada num epissoma ou num vetor de autorreplicação. Os exemplos de vetores de autorreplicação são vírus, em particular geminivírus ou plasmídeos.

Diversos vetores de transformação disponíveis para transformação de planta são conhecidos dos peritos na técnica, e as construções de ADN ou de nucleótidos de acordo com esta invenção (compreendendo a sequência viral P0 geneticamente modificada) podem ser utilizadas em conjunto com quaisquer desses vetores. A seleção de vetor depende da técnica de transformação preferida.

Os componentes do sistema de expressão podem ser modificados, por exemplo, para aumentar a expressão dos segmentos de ARN *sense* e *antisense*.

O promotor ligado de modo funcional às sequências de nucleótidos *sense* e/ou *antisense* de acordo com a invenção pode ser um promotor nativo da célula a transformar. O promotor, em alternativa, pode ser um promotor heterólogo, por exemplo um promotor específico de tecido, um promotor regulado em desenvolvimento, um promotor constitutivo ou um promotor induzível. Os promotores apropriados são bem conhecidos do perito na técnica. Na presente invenção, são preferidos promotores heterólogos fortes que são ativos em tecidos de raiz ou são essencialmente ativos aí (quando a expressão noutros tecidos não é desejada).

Vários terminadores de transcrição encontram-se

disponíveis para a utilização em cassetes de expressão. Estes são responsáveis pela terminação de transcrição para além do transgene e a respetiva poliadenilação correta. Os terminadores de transcrição apropriados são os que são conhecidos por funcionarem em plantas e incluem o terminador CaMV 35S, o terminador tm/, o terminador de opalina sintase e o terminador rbcS E9 de ervilha e afins.

As sequências (segmentos) de nucleótidos *sense* e *antisense* na sequência viral P0 (geneticamente modificada) de acordo com a invenção preferencialmente encontram-se sob controlo de um único promotor, especialmente quando ambos os segmentos são compreendidos numa única sequência de nucleótidos (em gancho). Contudo, cada uma destas pode estar igualmente sob controlo de um promotor diferente (por exemplo, quando a construção de ARN é feita de segmentos que são 2 moléculas diferentes). Isto é, a sequência de ADN *sense* pode ser ligada de modo funcional a um primeiro promotor e a sequência de ADN *antisense* ligada de modo funcional a um segundo promotor. O primeiro promotor e o segundo promotor podem ser o mesmo promotor ou podem ser promotores diferentes. O promotor pode ser um promotor divergente ou bidirecional capaz de iniciar a transcrição de sequências de ADN (nos dois segmentos de ARN) em cada lado do promotor.

A construção ou sequência de ARN ou ADN de acordo com a invenção, para além de uma sequência (fragmento) de nucleótidos viral (P0) modificada *sense* e *antisense*, compreende ainda vantajosamente uma sequência de nucleótidos ligantes ou espaçadores entre as sequências de ADN que codificam os segmentos de ARN *sense* e *antisense*.

É esperado que não existam nenhuns limites de comprimento ou requisitos de sequência associados à região de espaçador, desde que estes parâmetros não interfiram com a capacidade das regiões de ARN com a sequência (segmento) de nucleótidos *sense* e *antisense* para formar um ARN

bicatenário. Preferencialmente, a região de espaçador ou sequência varia em comprimento de cerca de 5 a cerca de 1000 bp, mais preferencialmente, de cerca de 10 a cerca de 500 bp, ainda mais preferencialmente de cerca de 50 a cerca de 200 bp.

Uma sequência de nucleótidos espaçadores ou ligantes preferida corresponde a uma sequência de intrões, preferencialmente uma na orientação *sense*, melhorando a eficiência de redução de expressão da sequência de nucleótidos alvo. O melhoramento na eficiência pode ser expressado como um aumento na frequência de plantas, em que o silenciamento ocorre, ou como um aumento no nível de redução de expressão viral.

As sequências (ou intrões) de nucleótidos de intrões preferidas são derivadas de genes de planta, como genes de ARN de ribossoma presumidos ou genes de planta altamente transcritos. Estes intrões podem ser derivados de qualquer gene de planta, mas preferencialmente são derivados de genes de planta dicotiledónea, p. ex. a partir de genes de *Petunia*, ainda mais preferencialmente são derivados de genes de beterraba. É igualmente possível utilizar apenas parte destes intrões (planta), por exemplo pelo menos as bordas que contêm sinais de *splicing* (excisão-junção) (consulte abaixo). A totalidade destes intrões e partes dos mesmos no contexto da invenção são referidas como "fragmentos de intrão" ou "sequências de intrão".

Um comprimento preferido para essas sequências de nucleótidos de intrões é entre cerca de 5 e cerca de 1000 bp, preferencialmente entre cerca de 50 e cerca de 600 bp, mais preferencialmente entre cerca de 90 e cerca de 550 bp. As sequências de intrões preferidas compreendem a sequência SEQ ID NO 11 ou 12, ou até mais preferencialmente consistem na sequência SEQ ID NO 11 ou 12.

A construção de ARN, compreendendo as sequências (de segmentos) de nucleótidos *sense* e *antisense* capazes de

formar, por exemplo, uma estrutura em gancho, que são produzidas pela transcrição do ADN recombinante correspondente, pode igualmente ser introduzida diretamente numa célula de planta.

Essas moléculas de ARN podem ser produzidas, p. ex. através de

- clonagem da região de ADN capaz de ser transcrita numa molécula de ARN com uma sequência de nucleótidos compreendendo uma sequência (de segmentos) de nucleótidos *sense* de pelo menos 10 (preferencialmente pelo menos 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais) nucleótidos consecutivos que têm entre 75 e 100 % de identidade de sequência com (pelo menos parte da) a sequência de nucleótidos de interesse e um nucleótido (segmento) *antisense* com pelo menos 10 nucleótidos, (preferencialmente pelo menos cerca de 15 nt, 20 nt, particularmente pelo menos cerca de 50 nt, mais particularmente pelo menos cerca de 100 nt, especialmente pelo menos cerca de 150 nt, mais especialmente pelo menos cerca de 200 nt, 250 nt, 300 nt, muito especialmente pelo menos cerca de 350 nt ou cerca de 400 nt) e que têm entre cerca de 75 % e cerca de 100 % de identidade de sequência com o complemento de nucleótidos da sequência de nucleótidos *sense* (e com o ARNm alvo), pelo que esta construção de ARN (compreendendo um segmento *sense* e um segmento *antisense*) é capaz de formar um ARN bicatenário através de emparelhamento de bases entre as regiões com sequência de nucleótidos *sense* e *antisense* resultante, por exemplo, numa estrutura de ARN em gancho;
- realização de uma reação de transcrição *in vitro* adicionando *inter alia* a ARN polimerase dependente de ADN adequada, bem como os reagentes necessários para gerar as moléculas de ARN; e

- isolamento das moléculas de ARN.

A invenção fornece ainda uma planta resistente ou tolerante a BMYV e/ou BNYVV que compreende no genoma de pelo menos parte das respectivas células, de preferência em substancialmente todas as respectivas células, uma sequência de P0 (geneticamente modificada; *sense* e/ou *antisense* e/ou em gancho) (e possivelmente também uma sequência *sense* e/ou *antisense* e/ou em gancho deduzida a partir do genoma de BNYVV) de acordo com a invenção e/ou um vetor compreendendo a mesma, que, quando transcrita, produz uma molécula de ARN que aciona PTGS de BMYV e possivelmente de BNYVV. É igualmente fornecida uma planta resistente ou tolerante a BMYV e/ou BNYVV que compreende pelo menos em parte das respectivas células, de preferência em substancialmente todas as respectivas células, uma molécula de ARN de acordo com a invenção para alcançar o efeito acima descrito.

Uma "planta" refere-se a qualquer planta ou parte de uma planta em qualquer estágio de desenvolvimento. Neste caso, são igualmente incluídas estacas, culturas de células ou tecidos e sementes. Conforme utilizado em conjunto com a presente invenção, o termo "tecido de planta" inclui, mas não se limita a, plantas inteiras, células de planta, órgãos de planta, sementes de planta, protoplastos, calos, culturas de célula e quaisquer grupos de células de planta organizados em unidades estruturais e/ou funcionais. Os últimos são igualmente referidos como estruturas reproduzíveis (de forma vegetativa), o que significa que as mesmas podem ser regeneradas numa planta inteira.

A planta transformada, os tecidos de planta e o material de planta obtidos podem ser utilizados numa reprodução convencional e em esquemas de propagação ou regeneração de plantas para produzir mais plantas transformadas com as mesmas características (resistência ou tolerância ao vírus) ou para introduzir a construção de ADN de acordo com a presente invenção noutras variedades da

mesma ou uma espécie de planta relacionada.

"Resistência ou tolerância ao vírus" significa, neste caso, que uma célula ou planta resistente ou tolerante não é suscetível ou reduziu a suscetibilidade a um ou mais vírus em comparação com uma célula ou planta sensível. No presente caso, são consideradas a resistência e preferencialmente a resistência extrema a infecções por BMV e/ou BNYVV. Tolerância, por exemplo, significa que os sintomas habituais de uma infecção por vírus são inexistentes ou reduzidos, ou que a acumulação ou replicação do vírus na célula é prevenida ou reduzida, ou que o movimento do vírus, por exemplo, de célula para célula é prevenido ou reduzido.

A invenção será em seguida mais descrita através de referência aos seguintes exemplos (não limitativos) detalhados.

EXEMPLOS

Para estudar a funcionalidade da sequência de P0 de indução de PTGS, foi construído um vetor *Agrobacterium* binário, por exemplo, de acordo com as Figuras 4A e 4B.

A criação das construções de ADN de acordo com a invenção e a clonagem destas construções para *Agrobacterium tumefaciens* (estirpe GV3101 (tornada inofensiva)) foram efetuadas de acordo com métodos e técnicas bem conhecidos na técnica. Os fragmentos *sense* e *antisense* (P0) e os intrões foram gerados através de amplificação genética (PCR) incluindo sítios de restrição específicos nas extremidades. Misturados com a estrutura principal de vetor, apenas foi possível uma recombinação/inserção dos fragmentos com base na compatibilidade destes sítios específicos na extremidade dos fragmentos.

A estirpe *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 que transporta uma construção em gancho foi utilizada para mediar a transformação de *Arabidopsis thaliana* através do método de mergulho floral. O material de folha de

Arabidopsis thaliana transgênica foi infetado pelo isolado natural BMV-2itb utilizando transmissão de pulgões ou através da estirpe BMV-EK emitida a partir do clone e pulgão infecciosos transmitidos.

Relativamente às experiências de transmissão de pulgões: para adquirir o vírus, foi permitido aos pulgões um período de acesso de aquisição (AAP) de 48 h em suspensão purificada de isolado BMV-2itb ou clone BMV-EK. Após o AAP, os pulgões foram transferidos com um pincel de ponta fina em folhas *Arabidopsis thaliana* transgênicas (10 pulgões por planta) durante um período de acesso de inoculação (IAP) de 96 h. Em seguida, os pulgões foram mortos através de tratamento com inseticida e a detecção de vírus através de ELISA foi efetuada 3 semanas mais tarde nas folhas sistêmicas.

Relativamente a todas as experiências abaixo, os dados ELISA foram avaliados por meio do software SAS 9.1 (método ANOVA) seguindo-se o teste de Tukey. O valor $P < 0,05$ indicou uma diferença significativa.

Exemplo 1

O mecanismo de silenciamento de ARN visa sequências conservadas e induz a respetiva degradação. As sequências mais conservadas nos Poliovírus residem na metade 3' do ARN.

É assumido que a expressão das construções em gancho com sequências deduzidas a partir de partes conservadas do genoma viral resulta (*in planta*) na formação de ARN_{bc} que é reconhecido e cortado em duplos de cerca de 21 a 24 nts (pARN_i) pela enzima Dicer. Os pARN_is específicos serão carregados num complexo RISC (complexo de silenciamento induzido por ARN), que irá por sua vez visar o ARN genômico viral homólogo e induzir a degradação do último. Como tal, o metabolismo do vírus será severamente enfraquecido e os sintomas da infeção viral serão reduzidos. Nos casos mais favoráveis, será obtida resistência total.

Os inventores primeiramente geraram duas sequências em gancho derivadas a partir da extremidade 3' viral do genoma viral (BMVYV).

A primeira construção albergou a sequência CP (coat protein - proteína de revestimento) denominada hpCP e a segunda a extremidade 3' da sequência RT (readthrough protein - proteína de transleitura) com a sequência de não codificação de extremidade 3' do genoma BMVYV denominada hpRT+Nc.

Ambas as construções foram utilizadas para transformar plantas *Arabidopsis thaliana* e, para cada, foram obtidas dez linhas transgênicas independentes e testadas relativamente à respectiva resistência contra BMVYV.

As plantas que expressam pARNi específico da extremidade 3' do genoma viral foram confrontadas com o vírus. Nenhuma planta transgênica foi resistente a BMVYV independentemente do gancho hpCP ou hpRT+Nc utilizado.

Exemplo 2

As construções hpP0(u) de codificação de *Arabidopsis thaliana* transgênicas de acordo com a invenção foram depois confrontadas com isolado BMVYV-2itb.

Foram criadas seis linhas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas independentes que expressam o ARNm hpP0 (ou hp0u). Os resultados obtidos com a construção 1 (Figura 4A) são resumidos na Figura 5. A análise ANOVA estatística efetuada revelou diferenças existentes nos valores ELISA de plantas transgênicas e de tipo selvagem ($p < 0,0001$). O teste de Tukey revelou a ausência de uma diferença significativa entre linhas transgênicas, ao passo que todas as linhas eram significativamente diferentes para Col0 Inf ($p < 0,05$) revelando a resistência das linhas transgênicas relativamente à inoculação de BMVYV.

As moléculas de pARNi específicas de P0 foram detetadas nas seis linhas, mas em níveis mais altos nas três linhas resistentes (hpP0-9, -10 e -12). Não foi

detetado nenhum pARNi nas plantas suscetíveis (Col 0).

Estes resultados realçam que as construções hpP0(u) são adequadas para induzir PTGS em plantas *Arabidopsis thaliana* e podem induzir resistência a BMV.

Exemplo 3

As experiências do exemplo 2 foram repetidas com a construção 2 (Figura 4B) e com um número mais alto (oito) de linhas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas confrontadas com isolado BMV-2itb.

Os resultados são resumidos na Figura 6. Relativamente a esta construção, exceto a linha hpP0beterraba-3, todas as linhas foram resistentes a BMV conforme confirmado pela análise estatística de Tukey e ANOVA ($p < 0,05$). Não foi observada nenhuma diferença significativa entre as linhas hpP0-12 e hpP0beterraba resistente. Os níveis de moléculas de pARNi específicas de P0 mostraram ser significativamente mais elevados nas linhas resistentes (hpP0beterraba-1, - 2, -5, -7 e -8) do que nas outras linhas.

Exemplo 4

Os resultados descritos no exemplo 2 e no exemplo 3 foram repetidos tanto com o tipo de linhas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas (hpP0-9, -10, -12, hpP0beterraba-2, -7 e -8) como com duas fontes de inóculo (BMV-EK ou BMV-2itb).

Os resultados são representados na Figura 7. Todas as linhas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas mostraram ser resistentes ao inóculo de BMV-EK ($p < 0,05$). As linhas transgênicas respondem de forma diferente ao isolado de BMV-2itb.

Considerados em conjunto, estes resultados indicam uma melhor proteção contra BMV quando o transgene contém o intrão de beterraba.

A indução de PTGS por meio de uma construção em gancho parece assim ser uma boa fonte de resistência contra uma infecção viral e, em particular, contra BMV.

A partir dos exemplos acima, parece que a resistência hpP0(u) derivada de patogénio hpP0(u) de acordo com a invenção é altamente eficiente.

As construções de hpP0 da invenção induziram com êxito resistência à planta derivada de patogénio. Todas as construções hpP0 testadas induziram uma degradação de ARN genómico através de PTGS, que resultou em plantas resistentes a BMVYV.

Exemplo 5

Os inventores testaram a eficiência de outras estratégias utilizando a construção hpCP compreendendo o gene que codifica a proteína cápside do genoma BMVYV e a sequência distal 3' (hpRT + construção NC do gene BMVYV que codifica a proteína RT seguida pela extremidade de não codificação do ARN BMVYV viral). Os inventores descobriram inesperadamente que estas duas construções adicionais foram ineficazes para a indução de uma resistência viral numa planta.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> SES

<120> Construções em gancho P0 e utilização

<130> BPSESS009BWO

<160> 18

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 659

<212> ADN

<213> Vírus do amarelecimento suave da beterraba

<220>

EP2723873B1

<221> gene

<222> (1)..(659)

<223> UTR 5' de BMV e P0

<220>

<221> UTR 5'

<222> (1)..(30)

<220>

<221> CDS

<222> (31)..(657)

<400> 1

```

caaaagaaac cagcaggat ctacagctct atg caa ttt cag ctt aaa aca aac      54
                               Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn
                               1                               5

agt ttc act tgt tcg ttg aac cga ccg cta aca gct aca gag cga gtt      102
Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val
   10                               15                               20

tta aac acc gcg tat ttt ctt acg aat cat tta ccg ctc gta act ttt      150
Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe
   25                               30                               35                               40

gag aat gaa aac tgt att cgt tct ctt ctc gct gct ctg cct ttg ctg      198
Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu
   45                               50                               55

ctc agt aag cag ctc gac ccc ggg agc ttt att tac gct ccc ggg aaa      246
Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly Ser Phe Ile Tyr Ala Pro Gly Lys
   60                               65                               70

cgc cag tct tta cga ctg gcc agg ttc tac aat tac tgc gga gcc gtg      294
Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val
   75                               80                               85

tta ccc agc act cgc aac att gac tta cga gtg ccc ccc aga aaa gac      342
Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp
   90                               95                               100

gtt aaa aga ttt tac ctt gcc cga aat tca ggc aga gat ctg ggg gag      390
Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu
  105                               110                               115                               120

agg cta caa cgc cgc aga gaa att ttc tct cgc ggt gaa gca gag ttt      438
Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Ile Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe
  125                               130                               135

aaa aag ttc ctt tca gta tgg tgt gct gaa agc gag aga aag cta cgg      486
Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg

                               140                               145                               150

gag agt cct aaa atc gat att aga atg gac cat att att atg gtc tta      534
Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg Met Asp His Ile Ile Met Val Leu
  155                               160                               165

cgc gat atg ggc act ctc ttg cac cgt ctg gta ctt gtt gaa gaa cta      582
Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu
  170                               175                               180

tac cat aga aat act tat gct gag ctc gct ttt tgc gtt cac cac ctt      630
Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu Leu Ala Phe Cys Val His His Leu
  185                               190                               195                               200

ttt ggt gaa gct cgt ggt atg gat ttt tg
Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp Phe
  205

```

<210> 2

<211> 209

<212> PRT

<213> Vírus do amarelecimento suave da beterraba

<400> 2

Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr
 20 25 30
 Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser
 35 40 45
 Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly
 50 55 60
 Ser Phe Ile Tyr Ala Pro Gly Lys Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg
 65 70 75 80
 Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp
 85 90 95
 Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg
 100 105 110
 Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Ile
 115 120 125
 Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys
 130 135 140
 Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg
 145 150 155 160
 Met Asp His Ile Ile Met Val Leu Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His
 165 170 175
 Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu
 180 185 190
 Leu Ala Phe Cys Val His His Leu Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp
 195 200 205

Phe

<210> 3

<211> 659

<212> ADN

<213> Vírus do amarelecimento suave da beterraba

EP2723873B1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(659)
<223> Antisense PO&5'UTR

<400> 3

```
caaaaatcca taccacgagc ttcacccaaa aggtggtgaa cgcaaaaagc gagctcagca    60
taagtatttc tatggtatag ttcttcaaca agtaccagac ggtgcaagag agtgcccata    120
tcgcgtaaga ccataataat atggtccatt ctaatatcga ttttaggact ctcccgtagc    180
tttctctcgc tttcagcaca ccatactgaa aggaacttit taaactctgc ttcaccgcga    240
gagaaaatit ctctgcggcg ttgtagcctc tccccagat ctctgcctga atttcgggca    300
aggtaaaatc ttttaacgtc ttttctgggg ggcactcgta agtcaatggt gcgagtgctg    360
ggtaacacgg ctccgcagta attgtagaac ctggccagtc gtaaagactg gcgtttcccg    420
ggagcgtaaa taaagctccc ggggtcgagc tgcttactga gcagcaaagg cagagcagcg    480
agaagagAAC gaatacagtt ttcattctca aaagttacga gcggtaaatg attcgtaaga    540
aaatacgcgg tgtttaaaac tcgctctgta gctgtttagc gtcggttcaa cgaacaagtg    600
aaactgtttg ttttaagctg aaattgcata gactgctaga tcctcgctgg tttcttttg    659
```

<210> 4
<211> 5722
<212> ADN
<213> Vírus do amarelecimento suave da beterraba

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5722)
<223> Genoma BMV

<400> 4

EP2723873B1

```
acaaaagaaa ccagcgagga tctagcagtc tatgcaatth cagcttaaaa caaacagttt    60
cacttgttcg ttgaaccgac cgctaacagc tacagagcga gttttaaaca ccgcgtatth    120
tcttacgaat catttaccgc tcgtaactth tgagaatgaa aactgtatth gttctcttct    180
cgctgctctg cctttgctgc tcagtaagca gctcgacccc gggagcttca tttactctcc    240
cgggaaacgc cagtctttac gactggccag gttctacaat tactgcggag ccgtgttacc    300
cagcactcgc aacattgact tacgagtgcc ccccagaaaa gacgttaaaa gattttacct    360
```

tgcccgaat	tcaggcagag	atctggggga	gaggctacaa	cgccgcagag	aaattttctc	420
tcgcggtgaa	gcagagttta	aaaagttcct	ttcagtatgg	tgtgctgaaa	gcgagagaaa	480
gctacgggag	agtcctaaaa	tcgatattag	aatggaccat	attattatgg	tcttacgcga	540
tatgggcact	ctcttcacc	gtctggtact	tgttgaagaa	ctataccata	gaaatactta	600
tgctgagctc	gctttttgcg	ttcaccacct	ttttggtgaa	gctcgtgga	tggatttttg	660
gcggttggct	aacttcctg	gtaaattggt	tatttgctct	cacgaaatgt	attttgaaaa	720
ctctttcatc	cagaaagagc	tacgtttgtg	agcgatctgt	aaaaggtttt	ctcaccttta	780
ccatcaaaaa	aagcccgcgc	cgtaattgca	ttcttcaaat	acaacacgca	gacggttccc	840
atgccggtta	tgcaacatgc	gtaaccttat	tcgacgggac	aaacggatty	ttgactgcgc	900
aacatgtagt	tgacgatttt	tacgaaggag	acccgagaaa	gactctaaaa	gtcgtctcca	960
cccgaatgg	aaacaaaatc	ccccttgatg	aattcagagt	gacgtacaca	tctgagaaaa	1020
gggatcagtt	gttgatgcat	gggcccccaa	actgggaagg	agttcttgcc	tgcaaggcag	1080
ttcacatgat	tccggcatcg	agtgttgcaa	aatcgaaaagc	aactttcttt	gctctgtcgg	1140
atggtgaatg	gcattcctct	aatgccgagc	tcgttggcac	atccaagtgc	ggaaaattca	1200
ttctgtact	cagtgcacaca	aagagtggtc	attcggggcac	tccctatttc	aatggtaaga	1260
gtgttcttgg	agttcacata	ggctctccga	aagaatttga	gtcggaaaaat	gttaactaca	1320
tgtctcctat	accacgtttt	cctggattaa	ccagcccga	ctacatattt	gaaaccacag	1380
cccttgctgg	aaaatftttc	agccaagagg	aagtccaaga	gctaattgaa	gacttctctc	1440
tccaagagat	ttattctata	gcgacggcac	gtgggaagta	cataaaatat	gaggcttgtc	1500
caggtgaaga	gacattccat	gatgtgctaa	cagagtcctc	cccgatgcag	ggggaaggaa	1560
gggcccgtcc	gaccgccgga	acaaccggaa	acgcaagcac	ccacgagaga	tccgcaggaa	1620
atggaaaaag	ccctcgtgct	gctccttcta	caccgcggga	acccttgggtg	aaaactgcac	1680
cgcaagccac	gtacattgta	cctcaaaaaga	ggaatatgac	gaatggccga	gatgctgggtg	1740
ccaaattgca	ggccacgaet	gccactaccg	atcaaatctc	agagataaag	aaggctctga	1800
tagacaaaat	ggatttgaaa	tcgatcgaga	gacaagtggg	agagacacta	tcgtcgatgg	1860
ccatgaagaa	gccccgctca	agagggcgga	gaagatccaa	gaacaagcaa	aacaatttgg	1920
acgttcttc	aaaaccaggt	accactggga	aagagccgca	gaggtctgcc	ccggtttcat	1980
caaagtcggt	gagctcccca	agttttactt	ctctaaacaa	aaaggatgct	cggattgggg	2040
cacgaagctc	accagcctcc	accagaatt	ggaggagaaa	acccgaggct	tccgggtggcc	2100
caagttcggg	ccagcggcgg	aactgaaatc	cttgcggcta	caagccgcaa	gatggctcga	2160
acgcgccgag	caagttaaaa	tcccttcaac	tgaggaaagg	gagcgcgtcg	tgaggaaaty	2220
tgtggaagca	ttctcgccca	ctcaaacacg	aggtcccatg	gccacgagag	gaaacaaact	2280
gtcttggaac	aatttccttg	aagattttaa	aacggcagtt	ttctctctcg	agctcgaagc	2340
cggcgtaggc	gtcccgtatg	ttgcttacgg	tcgacgcacg	cacagaggct	ggattgaaga	2400
tccagatctg	ttgccggttt	tagctcgttt	caccttcgat	cgattacaga	agttatcgga	2460

ggtgaaattt gagcatatga gccctgaaca attggttcag gaaggtctgt gtgaccaat 2520
 acggttattc gtaaaaggcg agccacacaa acaatccaaa cttgatgaag gacgctaccg 2580
 cctcatcatg agtgtctcat tggttgatca actggtagcc cgggttctgt ttcaaaatca 2640
 gaacaagcgc gagatcgcgc tttggagggc gattccctca aaacccggat tctgattgtc 2700
 cacagacgga caagtcgtcg atttcatgca agcattatcg gcgcaggtgg gagtgaacac 2760
 tgctgaatta ctccaaaatt ggaaatccca ccttattcct acagattgct ctggttttga 2820
 ctggagcgtt tctgactggc ttctagagga tgaatggaa gtccggaaca ggctcacggt 2880
 ggacataaat gatctaacca ggcgtctcg agctggatgg cttaaagcc tgcmaaag 2940
 tgttctctgt ctatcagatg gaacattgct ctcgcagcaa gtgcctggtg tacaaaagag 3000
 tggcagctac aacacctcct cgtctaacct tagaattcga gtgatggccg cttaccactc 3060
 cggagcctcc tgggccatcg ccatgggtga tgatgccctt gaatctgtag atgcagacct 3120
 aagtcgatac tcatccttag gcttcaaagt cgaggtttct tcacaactgg aattctgtct 3180
 tcacattttt gaggaggaga acctcgccgt tccggtaaac aaagctaaa tgctttataa 3240
 attgatacat gtttatgaac cggaatgtgg caacctgaa gttctgacga actatcttgc 3300
 agcttgtttc tcaattttaa acgagctgag atccgatcaa gaactcgttg cctccctcta 3360
 tcagtggctg gtccttcag tgcagccaca aaagatataa cgagggacaa tataaacagc 3420
 cgggtaaaca tcagttgcaa acgccggaag tttaaagtct gattacataa caagccaaaa 3480
 tagatttcaa gtttttagca ggattttcaa gtggtctatg tcagcaatac ctgtaacggg 3540
 agttggcttg tatttctctt accttaagat ttctcaccac gtcagatcaa ttgttaatga 3600
 atacggtcgt gggtaggaga acgatcaatg gaagaagacg accacgtagg caaacacgac 3660
 gcgctcagcg ctctcagcca gtggttgtgg tccaagctc tcggacaaca caacgccgac 3720
 ctagacgacg acgaagaggc aacaaccgga caagaagaac tgtttctacc agaggaacag 3780
 gttcagcga gacattcgtt ttctcaaaag acaatctcgc gggaggtcc agcggagcaa 3840
 tcacgttcgg gccgagtcta tcagactgcc cggcattcgc tgatggaatg ctcaaggcct 3900
 accatgagta taaaatctca atggtcattt tggagttcgt ctccgaggcc tcttcccaaa 3960
 attccggttc catcgcttac gagctggacc cacactgtaa actcagtgcc ctttcatcaa 4020
 ccattaacaa gttcgggatc acaaaaccg gcaggagggc atttgacgcg tcttacatca 4080
 acggggcgga ctggcatgac gttgccaaag accaattcag gatcctctac aaaggcaatg 4140
 gttcttcate gatagctggt tcttttagaa tcacatgaa gtgccagtc cacaatccga 4200
 aataggtaga caaggaacct gccctagcc cagggccttc tccctctcca caaccacac 4260
 cctcaaagaa atatcgtttt atcgtctata ctggtgtccc tgtgacctgt ataatggccc 4320
 aatccactga tgacgccatc tctctgtacg acatgccttc ccaacggtt cgtacatag 4380
 aagacgagaa tatgaaactg acaaacctcg attctcgatg gtattcccag aattctttga 4440
 aagccatccc aatgataata gtaccagtc ctcaagggtga gtggactgtg gaaatttoga 4500
 tggaggggta tcaaccaacc tcaagcacca cagatcctaa taaggacaaa caagatggtc 4560

EP2723873B1

```
ttattgcata taatgatgac ctcaaggagg gttggaatgt aggggtttat aacaatgtgg 4620
agataaccaa caataaggct gataacactt tgaagtacgg ccatccagac atggagctca 4680
atagttgtca ttttaatcaa ggacaatggt tggaaagaga tggagatttg acttgtcacc 4740
ttaaacaac tggtgacaat gcctccttct ttgttgttgg tcccgtgtc cagaagcaat 4800
ccaaatacaa ttatgccgtt tcatacggag cctggacaga tcggatgatg gagatagggg 4860
tgatagccat agcacttgat gaacaaggct catccggttc cgcaaagata gaaagaccaa 4920
agagagtggg gcactccatg gcagtctcaa cctgggagac tataaactta ccggagaagg 4980
aaaactccgg tgaattcaa accgatcaa gacaagatct caaaactcct cccacatctg 5040
gtgggagttc cgatatgccg gatatcgttc aaggaggctt accccttccc attgaagaag 5100
acattcttga tttcatcagg gatgacctt ggtccaacat accggccaag acttcgctggg 5160
aagacgaggg tgcgtcatca aagagtgtt ttaaacccca attgaagcct cctggcttgc 5220
caaagccaca accggtcaga acgatccgaa acttcgatcc agaacctgac ttggttgagg 5280
catggcgacc tgacgtgaac cccggatatt ccaaggaaga cgtggcagcg gccactgtta 5340
tgtacggggg tccgttaat gaaggccggt ctatgattga caagcgtgat aaagctgtgt 5400
tagacggccg caagagtggg gttcttctt tggcgtcctc cttgacggga ggcacgctta 5460
aggcctctgc aaagtcagag aagcttgcca aactcacttc gagtgaaagg gcgcagttca 5520
aacgaattaa gcgccagcaa ggtgccacac gagcttcaga attttagaa caacttctgg 5580
ctggcacaaa ccttgacca aggtcctgat gaaccttcc caatcatcac agtcaagccc 5640
gtgactttaa acgcggaacg actccgaaag gataggcaac gagtgtttta cgtgggata 5700
actcctacg gcacttcggt gt 5722
```

<210> 5

<211> 397

<212> ADN

<213> Vírus da veia amarela necrótica da beterraba

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(397)

<223> P15 mutante (*sense*)

<400> 5

EP2723873B1

```
ggtgcttggtg gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttgtgt    60
tgttgtcagt atgttgact caccgttttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc    120
gggagcaatt ttaagggga gcggtgtat catggccgcy aattcgtttg ctcaatttgg    180
gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aaggttgcca ccaaagagca    240
cgatggtgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgttgtga ctctcaccga    300
aactattttt ataataattat ctagattggt tggtttggcg gtgtttttgt tcatgatatg    360
tttaatgtct atagtttgggt tttggtatca tagataa                               397
```

<210> 6

<211> 397

<212> ADN

<213> Vírus da veia amarela necrótica da beterraba

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(397)

<223> BNYVV P15 mutante (*antisense*)

<400> 6

```
ttatctatga taccaaaacc aaactataga cattaaacat atcatgaaca aaaacaccgc    60
caaaccaaac aatctagata atattataaa aatagtttcg gtgagagtca caacacgaac    120
ggtcacttca ccccttttta ccattatgtc aacatcgtgc tctttggtgg caaccttagt    180
gatggactcg gctacatgct ttggaatata gcaactccca aattgagcaa acgaattcgc    240
ggccatgata cagccgetcc ccttaaaaat tgctcccgca tagctggacg cttaacatc    300
gttgctgaaa aacggtgagt acaacatact gacaacaaca caaccggcaa ctatgtacaa    360
tacaatatta gataaatcta cttaaccac aagcacc                               397
```

<210> 7

<211> 1056

<212> ADN

<213> BMYV e BNYVV

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1056)

EP2723873B1

<223> P0 P15 *sense*

<400> 7

```
ggtgcttggt gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttggtg      60
tgtgtgcagt atgttgact caccgttttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc      120
gggagcaatt ttttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg      180
gagttgcatg attccaaagc atgtagccga gtccatcact aaggttgcca ccaaagagca      240
cgaatgtgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgttggtga ctctcaccga      300
aactatTTTT ataatattat ctgattggtt tggtttggcg gtgtttttgt tcatgatatg      360
tttaatgtct atagtttggg tttggtatca tagataacaa aagaaaccag cgaggatcta      420
gcagtctatg caatttcagc ttaaaacaaa cagtttcact tgttcgttga accgaccgct      480
aacagctaca gagcgagttt taaacaccgc gtattttcct acgaatcatt taccgctcgt      540
aacittttgag aatgaaaact gtattcgttc tcttctcgtc gctctgcctt tgctgctcag      600
taagcagctc gacccccgga gctttattta cgctccccgg aaacgccagt ctttacgact      660
ggccagggtc tacaattact gcggagccgt gttaccagc actcgcaaca ttgacttacg      720
agtgcccccc agaaaagacg ttaaagatt ttaccttgcc cgaaattcag gcagagatct      780
gggggagagg ctacaacgcc gcagagaaat tttctctcgc ggtgaagcag agtttaaaaa      840
gttcctttca gtatggtgtg ctgaaagcga gagaaagcta cgggagagtc ctaaaatcga      900
tattagaatg gaccatatta ttatggtcct acgcgatatg ggcactctct tgcaccgtct      960

gggtacttgtt gaagaactat accatagaaa tacttatgct gagctcgtct tttgcgttca     1020
ccaccttttt ggtgaagctc gtggtatgga tttttg                                  1056
```

<210> 8

<211> 1056

<212> ADN

<213> BMYV e BNYVV

<220>

<221> misc__feature

<222> (1)..(1056)

<223> P0 P15 *antisense*

<400> 8

EP2723873B1

```
caaaaatcca taccacgagc ttcaccaaaa aggtgggtgaa cgcaaaaagc gagctcagca    60
taagtatttc tatggatag ttcttcaaca agtaccagac ggtgcaagag agtgcccata    120
tcgcgtaaga ccataataat atgggccatt ctaatatcga ttttaggact ctcccgtagc    180
tttctctcgc tttcagcaca ccatactgaa aggaactttt taaactctgc ttcaccgcca    240
gagaaaattt ctctgcgccg ttgtagcctc tccccagat ctctgcctga atttcgggca    300
aggtaaaatc ttttaacgct ttttctgggg ggcactcgta agtcaatggt gcgagtctg    360
ggtaacacgg ctccgcagta attgtagaac ctggccagtc gtaaagactg gcgtttcccg    420
ggagcgtaaa taaagctccc ggggtcgagc tgcttactga gcagcaaagg cagagcagcg    480
agaagagaac gaatacagtt ttcattctca aaagttacga gcggtaaatg attcgtaga    540
aaatacgcgg tgtttaaacc tcgctctgta gctgttagcg gtcggttcaa cgaacaagtg    600
aaactgtttg ttttaagctg aaattgcata gactgctaga tcctcgctgg tttcttttgt    660
tatctatgat accaaaacca aactatagac attaaacata tcatgaacaa aaacaccgcc    720
aaaccaaaaca atctagataa tattataaaa atagtttcgg tgagagtcac aacacgaacg    780
gtcacttcac ccctttttac cattatgtca acatcgtgct ctttgggtggc aaccttagtg    840
atggactcgg ctacatgctt tggaatatcg caactcccaa attgagcaaa cgaattcgcg    900
gccatgatac agccgctccc cttaaaaatt gctcccgcac agctggacgc tttaacatcg    960
ttgctgaaaa acggtgagta caacatactg acaacaacac aaccggcaac tatgtacaat 1020
acaatattag ataaatctac ttttaaccaca agcacc                               1056
```

<210> 9

<211> 1058

<212> ADN

<213> BMYV e BNYVV

<220>

<221> misc_feature

<223> P0 P15 sense

<400> 9

```
caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaac aaacagtttc    60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatfff    120
cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctctctc    180
```

EP2723873B1

```
gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccg ggagctttat ttacgctecc 240
gggaaacgcc agtcctttacg actggccagg ttctacaatt actgcgagc cgtgttacc 300
agcactcgca acattgactt acgagtgcc cccagaaaag acgittaaaag attttacctt 360
gcccgaatt caggcagaga tctgggggag aggctacaac gccgcagaga aattttctct 420
cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaaag 480
ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcat 540
atgggcactc tcttgcaccg tctggctactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat 600
gctgagctcg ctttttgcgt tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttga 660
tggtgcttgt ggtaaagta gatttatcta atattgtatt gtacatagtt gccggttgtg 720
ttgttgcag tatgttttac tcaccgtttt tcagcaacga tgtaaagcg tccagctatg 780
cgggagcaat ttttaagggg agcggctgta tcatggccgc gaattcgttt gctcaatttg 840
ggagttgca tattccaaag catgtagccg agtccatcac taaggttgcc accaaagagc 900
acgatgttga cataatgta aaaaggggtg aagtgaccgt tcgtgttgtg actctcaccg 960
aaactatttt tataatatta tctagattgt ttggtttggc ggtgtttttg ttcatgatat 1020
gtttaatgtc tatagtttgg ttttggatc atagataa 1058
```

<210> 10

<211> 1572

<212> ADN

<213> BMYV e BNYVV

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1572)

<223> P0 P15 *antisense*

<400> 10

```

ggtgcttggtg gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttggtg      60
tgttgtcagt atggtgtact caccgttttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc      120
gggagcaatt ttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg      180
gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aagggttgcca ccaaagagca      240
cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgttggtga ctctcaccga      300
aactattttt ataataattat ctgattgtt tggtttggcg gtgtttttgt tcatgatatg      360
ttaatgtct atagtttggg tttggtatca tagataacct aggaaattta aattaaatcc      420
tggttttata tgtactactg ttgtagctga aatttaggtc ttcttgctga atttatctct      480
gtttcgtttt cactgttatt caggggatcc taggttatct atgataccaa aaccaaacta      540
tagacattaa acatatcatg aacaaaaaca ccgccaaacc aaacaatcta gataatatta      600
taaaaatagt ttcggtgaga gtcacaacac gaacggtcac ttcacccctt tttaccatta      660
tgtcaacatc gtgctctttg gtggcaacct tagtgatgga ctcggttaca tgctttggaa      720
tatcgcaact cccaaattga gcaaacgaat tcgcgcccat gatacagccg ctccccttaa      780

aaattgctcc cgcatagctg gacgcittaa catcgttget gaaaaacggt gagtacaaca      840
tactgacaac aacacaaccg gcaactatgt acaatacaat attagataaa tctactttaa      900
ccacaagcac catcaaaaat ccataaccag agcttcacca aaaagggtgt gaacgcaaaa      960
agcagctca gcataagtat ttctatggta tagttcttca acaagtacca gacggtgcaa     1020
gagagtgtccc atatcgcgta agaccataat aatatggtcc attctaatat cgattttagg     1080
actctcccgt agctttctct cgttttcagc acaccatact gaaaggaact ttttaaactc     1140
tgcttcaccg cgagagaaaa tttctctgcg gcgttgtagc ctctcccccga gatctctgcc     1200
tgaatttcgg gcaaggtaaa atcttttaac gtcttttctg gggggcactc gtaagtcaat     1260
gttgcgagtg ctgggtaaca cggctccgca gtaattgtag aacctggcca gtcgtaaaga     1320
ctggcgtttc ccgggagcgt aaataaagct cccggggtcg agctgcttac tgagcagcaa     1380
agycagagca gcgagaagag aacgaatata gttttcattc tcaaaagtta cgagcggtaa     1440
atgattcgta agaaaatagc cgggtgttaa aactcgtctc gtagctgtta gcggtcgggt     1500
caacgaacaa gtgaaactgt ttgttttaag ctgaaattgc atagactgct agatcctcgc     1560
tggtttcttt tg                                             1572

```

<210> 11

<211> 1351

<212> AND

<213> *Petunia* sp.

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1351)

<223> Intrao de petunia

<400> 11

```

gtgtaagaat ttcttatggt acattattac attcaacggt ttatcttaat tggctcttca    60
tttgattgaa atttgacaat ttttcttgt tttttttttt gtcacactct ttttgggttg    120
gggtggccga cgaattgtgg gaaggtagaa agaggggagg acttttggtt tactccatta    180
gtaattactgy tttccgtttc aatttatgtg acaatatttc ctttttagtc ggttccaaaa    240
gaaaaatgtca gcattataaa caatttaatt ttgaaattac aattttgcca ttaataaaaat    300
gatttacaac cacaaaagta tctatgagcc tgtttgggtg ggcttataag cagcttattt    360
taagtggcct ataagtcaaa aagtgacant ttttgagaag ttagaaaatc ctaactcttc    420
aaaaagtagc ttttaagcca cttatgactt ataagtccaa aaatttttaa gttaccaaac    480
atatattaat gggtttataa gcttataagc cacttttaag ctcacccaaa cgggttctat    540
gtctcacttt agactacaaa ttttaaaagt cttcattttt ttcttaatct ccgtggcgag    600
tnaaactata acacataaag tgaaacggag ggaataagat ggagtcataa actaatccaa    660
atctatactc tctccggtta tttgtttttt agtttgattt ggtacattaa taaaacagat    720
ttttcgaagg ttataaacac agacagatgt ttcccagcga gctagcaaaa ttccaagatt    780
tctgtcgaaa attcgtgtgt ttctagctag tacttgatgt tatctttaac cttttagtaa    840
tttttgttcc ttttctttct atttttcctc ttacaatgaa ttatgagcaa gttccttaag    900

tagcatcaca cgtgagatgt tttttatgat attgactaaa tccaatcttt accattcctt    960
aactagtaaa atacaacaca tgtaattga tacattgctt aacctgagg ttagaaaatt    1020
ttagaaatta gttgtccaaa tgctttgaaa ttagaaatct ttaatccctt attttttttt    1080
aaaatgtttt ttctcactcc aaagaaagag aaactgacat gaaagctcaa aagatcatga    1140
atcttactaa ctttgtggaa ctaaaatgtac atcagaatgt ttctgacatg tgaaaatgaa    1200
agctcttaat tttcttcttt tattttattga gggtttttgc atgctatgca ttcaatttga    1260
gtacttttaa gcacctataa acacttactt acacttgcct tggagtttat gtttttagtgt    1320
ttcttcaca tcttttttgg tcaatttga g    1351

```

<210> 12

<211> 91

<212> AND

<213> *Beta vulgaris*

<220>

<221> misc__feature

<222> (1)..(91)

<223> Intrão de beterraba

<400> 12

taaatcctgg ttttatatgt actactgttg tagctgaaat ttaggtcttc ttgctgaatt 60
tatttctgtt tcgttttcac tgttattcag g 91

<210> 13
<211> 2701
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> P0 em gancho

<220>
<221> misc_feature
<222> (1064)..(1064)
<223> n corresponde a a, c, g ou t

<220>
<221> misc_feature
<222> (1277)..(1277)
<223> n corresponde a a, c, g ou t

<400> 13

caaaagaaac cagcgaggat cttagcagtct atgcaatttc agcttaaaac aaacagtttc 60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatttt 120
cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc 180
gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctgcaccccg ggagctttat ttaagctccc 240
gggaaacgcc agtctttacg actggccagg ttctacaatt actgcggagc cgtgttacct 300
agcactcgca acattgactt acgagtgcc cccagaaaag acgttaaaag attttacctt 360
gcccgaatt caggcagaga tctgggggag aggctacaac gccgcagaga aattttctct 420
cgcgggtaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag 480

ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcat 540
atgggcactc tcttgaccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat 600
gctgagctcg cttttgctg tcaccacctt tttggtgaag ctcgtggtat ggatttttgc 660
ctaggaaatt taaatgtgta agaatttctt atgttacatt attacattca acgttttatc 720
ttaattggct cttcatttga ttgaaatttg acaattattt cttgtttttt tttttgtcac 780
actctttttg ggttggggtg gccgacgaat tgtgggaagg tagaaagagg ggaggacttt 840
tgttatactc cattagtaat tactgtttcc gtttcaattt atgtgacaat atttcctttt 900
tagtcggttc caaaagaaaa tgtcagcatt ataacaatt taattttgaa attacaattt 960
tgccattaat aaaatgattt acaaccacaa aagtatctat gagcctgttt ggggtgggctt 1020
ataagcagct tttttaagt ggcttataag tcaaaaagt acantttttg agaagttaga 1080
aaatcctaac tctcaaaaa gttagcttta agccacttat gacttataag tccaaaaatt 1140
tttaagttac caaacatata ttaatgggtt tataagctta taagccactt ttaagctcac 1200
ccaaacgggt tctatgtctc actttagact acaaatttta aaagtcttca tttatttctt 1260
aatctccgtg gcyaytnaaa ctataacaca taaagtgaaa cggagggaaat aagatggagt 1320
cataaactaa tccaaatcta tactctctcc gtttaattgt tttttagttt gatttggtag 1380
attaataaaa cagatttttc gaaggttata aacacagaca gatgtttccc agcgagctag 1440
caaaattcca agatttctgt cgaaaattcg tgtgtttcta gctagtactt gatgttatct 1500
ttaacctttt agtaattttt tgccttttc tttctatttt tcatcttaca atgaattatg 1560
agcaagttcc ttaagtagca tcacacgtga gatgtttttt atgatattga ctaaatccaa 1620
tctttaccat tcttaacta gtaaaatca acacatgtta attgatacat tgcttaacac 1680
tgaggttaga aaattttaga aattagttgt ccaaatgctt tgaattaga aatctttaat 1740
cccttatttt ttttaaaat gtttttctc actccaaaga aagagaaact gacatgaaag 1800
ctcaaaagat catgaatctt actaactttg tggaaactaa tgtacatcag aatgtttctg 1860
acatgtgaaa atgaaagctc ttaattttct tcttttattt attgagggtt tttgcatgct 1920
atgcattcaa tttgagtact ttaaagcacc tataaacact tacttacact tgccttggag 1980
tttatgtttt agtgttttct tcacatcttt tttggtcaat ttgcaggtat ttggatccta 2040
ggcaaaaatc cataccacga gcttcaccaa aaaggtggtg aacgcaaaaa gcgagctcag 2100
cataagttat tctatggtat agttcttcaa caagtaccag acggtgcaag agagtgccca 2160
tatecgtaa gaccataata atatggtcca ttctaataac gatttttagga ctctcccgta 2220
gctttctctc gctttcagca caccatactg aaaggaactt tttaaactct gcttcaccgc 2280
gagagaaaaat ttctctgctg cgtttagacc tctcccccag atctctgcct gaatttcggg 2340
caaggtaaaa tcttttaacg tcttttctgg ggggcactcg taagtcaatg ttgagagtgc 2400
tgggtaacac ggctccgag taattgtaga acctggccag tcgtaaagac tggcgtttcc 2460
cgggagcgtg aataaagctc ccggggtcga gctgcttact gagcagcaaa ggcagagcag 2520
cgagaagaga acgaatacag ttttcattct caaaagttac gagcggtaaa tgattcgtaa 2580
gaaaatacgc ggtgtttaaa actcgcctctg tagctgttag cggtcgggtc aacgaacaag 2640
tgaaactgtt tgttttaagc tgaaattgca tagactgcta gatcctcgct ggtttctttt 2700
g 2701

EP2723873B1

<210> 14

<211> 1435

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> P0 em gancho (intrão de beterraba)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1435)

<223> P0 em gancho (intrão de beterraba)

<400> 14

```

caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaac aaacagtttc      60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatttt    120
cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc    180
gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctgcaceccg ggagctttat ttacgctccc    240
gggaaacgcc agtcttttac actggccagg ttctacaatt actgcccagc cgtgttacct    300
agcactcgc aacattgactt acgagtgccc cccagaaaag acgttaaaag attttacctt    360
gcccgaatt caggcagaga tctgggggag aggctacaac gccgcagaga aattttctct    420
cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaag    480
ctacgggaga gtccataaat cgataataga atggaccata ttattatggt cttacgcgat    540
atgggcactc tcttgaccg tctgggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat    600
gctgagctcg ctttttgctg tcaccacctt tttggtgaa ctcgtggtat ggatttttgc    660
ctaggaaatt taaattaaat cctggtttta tatgtactac tgtgtagct gaaatntag    720
tcttcttgct gaatttattt ctgtttcggt ttcactgta ttcaggggat cctaggcaaa    780
aatccatacc acgagcttca ccaaaaagggt ggtgaacgca aaaagcgagc tcagcataag    840
tatttctatg gtatagttct tcaacaagta ccagacggtg caagagagtg cccatatcgc    900
gtaagaccat aataatatgg tccattctaa tatcgatttt aggactctcc cgtagcttcc    960
tctcgtttc agcacaccat actgaaagga actttttaa ctcctgctca ccgcgagaga   1020
aaatctctc gcggcggtgt agcctctccc ccagatctct gctgaattt cgggcaaggt   1080
aaaaatcttt aacgtctttt ctggggggca ctcgtaagtc aatggttcga gtgctgggta   1140
acacggctcc gcagtaattg tagaacctgg ccagtcgtaa agactggcgt ttcccgggag   1200
cgtaataaaa gctcccgggg tcgagctgct tactgagcag caaaggcaga gcagcgagaa   1260
gagaacgaat acagttttca ttctcaaaag ttacgagcgg taaatgattc gtaagaaaat   1320
acgcggtggt taaaactcgc tctgtagctg ttagcggctg gttcaacgaa caagtgaac   1380
tgtttgttt aagctgaaat tgcatagact gctagatcct cgctggttcc ttttg      1435

```

<210> 15

<211> 2229

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> P0 P15 em gancho

<400> 15

ggtgcttgtg gttaaagtag atttatctaa tattgtattg tacatagttg ccggttgtgt 60
 tgtttgcagt atgtttgact caccgttttt cagcaacgat gttaaagcgt ccagctatgc 120
 gggagcaatt ttttaagggga gcggctgtat catggccgcg aattcgtttg ctcaatttgg 180
 gagttgcgat attccaaagc atgtagccga gtccatcact aaggtytcca ccaaagagca 240
 cgatgttgac ataatggtaa aaaggggtga agtgaccgtt cgtgtttgtga ctctcaccga 300
 aactattttt ataataattat ctagattggt tggtttggcg gtgtttttgt tcatgatatg 360
 tttaatgtct atagtttggg tttggatatca tagataacaa aagaaaccag cgaggatcta 420
 gcagctctat caatttcagc ttaaaacaaa cagtttctact tgttcgttga accgaccgct 480
 aacagctaca gagcgagttt taaacaccgc gtattttctt acgaatcatt taccgctcgt 540
 aacttttgag aatgaaaact gtattcgttc tcttctcget gctctgcctt tgyctgctcag 600
 taagcagctc gacccccgga gctttattta cgctccccgg aaacgccagt ctttacgact 660
 ggccagggtc tacaattact gcggagccgt gttaccacgc actcgcaca ttgacttacg 720
 agtgccccc agaaaagacg ttaaaagatt ttaccctgcc cgaaattcag gcagagatct 780
 gggggagagg ctacaacgcc gcagagaaa tttctctcgc ggtgaagcag agtttaaaaa 840
 gttcctttca gtatggtgtg ctgaaagcga gagaaagcta cgggagagtc ctaaaatcga 900
 tattagaatg gaccatatta ttatggtctt acgcgatatg ggcactctct tgcaccgtct 960
 ggtactigtg gaagaactat accatagaaa tactttatgct gagctcgtt tttgcttca 1020
 ccaccttttt ggtgaagctc gtggtatgga tttttgccta ggaaatttaa attaaatcct 1080
 ggttttatat gtactactgt tgtagctgaa atttaggtct tcttgctgaa tttatttctg 1140
 tttcgttttc actgtttatc aggggatcct aggcacaaaat ccataccacg agcttcacca 1200
 aaaaggtggt gaacgcacaaa agcgagctca gcataagtat ttctatggta tagttcttca 1260
 acaagtacca gacggtgcaa gagagtgcc atatcgcgta agaccataat aatattgtcc 1320
 attctaatat cgattttagg actctccctg agctttctct cgctttcagc acaccatact 1380
 gaaaggaact ttttaaacct tgcctcaccg cgagagaaaa tttctctcgc gcgtttagc 1440
 ctctccccc gatctctgcc tgaatttcgg gcaaggtaaa atcttttaac gtcttttctg 1500
 gggggcactc gtaagtcaat gttgagagtg ctgggtaaca cggtccgca gtaattgtag 1560
 aacctggcca gtcgtaaaga ctggcgttcc cggggagcgt aaataaagct cccggggtcg 1620
 agctgcttac tgagcagcaa aggcagagca gcgagaagag aacgaatata gttttcattc 1680
 tcaaaagtta cgagcggtaa atgattcgtg agaaaatagc cgggtgttaa aactcgtct 1740
 gtagctgtta gcggtcgggt caacgaacaa gtgaaactgt ttgttttaag ctgaaattgc 1800
 atagactgct agatcctcgc tggtttcttt tgttatctat gataccaaaa ccaaactata 1860
 gacattaaac atatcatgaa caaaaacacc gccaaaccaa acaatctaga taatattata 1920
 aaaatagttt cggtgagagt cacaacacga acggtcactt caccctttt taccattatg 1980
 tcaacatcgt gctcttttgg ggcaacctta gtgatggact cggctacatg ctttggaaata 2040
 tcgcaactcc caaattgagc aaacgaattc gcggccatga tacagccgct ccccttaaaa 2100
 attgctcccg catagctgga cgctttaaca tcgttctgta aaaacgggtga gtacaacata 2160
 ctgacaacaa cacaaccggc aactatgtac aatacaatat tagataaatc tactttaacc 2220
 acaagcacc 2229

<210> 16
 <211> 2233
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> P15 P0 em gancho

<400> 16

```

caaaagaaac cagcgaggat ctagcagtct atgcaatttc agcttaaaac aaacagtttc      60
acttgttcgt tgaaccgacc gctaacagct acagagcgag ttttaaacac cgcgtatttt      120
cttacgaatc atttaccgct cgtaactttt gagaatgaaa actgtattcg ttctcttctc      180
gctgctctgc ctttgctgct cagtaagcag ctcgaccccc ggagctttat ttacgctccc      240
gggaaacgcc agtcttttac actggccagg ttctacaatt actgcccagc cgtgttaccc      300
agcactcgca acattgactt acgagtgccc cccagaaaag acgttaaaag atttfacctt      360
gcccgaatt caggcagaga tctgggggag aggctacaac gccgcagaga aattttctct      420
cgcggtgaag cagagtttaa aaagttcctt tcagtatggt gtgctgaaag cgagagaaaag      480
ctacgggaga gtcctaaaat cgatattaga atggaccata ttattatggt cttacgcgat      540
atgggcactc tcttgcaccg tctggtactt gttgaagaac tataccatag aaatacttat      600
gctgagctcg ctttttgcgt tcaccacctt tttggtgaag ctcggtggtat ggatttttga      660
tggtgcttgt ggttaaagta gatttatcta atattgtatt gtacatagtt gccggttgtg      720
ttgttgtcag tatgtttgac tcaccgtttt tcagcaacga tgttaaagcg tccagctatg      780
cgggagcaat ttttaagggg agcggctgta tcatggccgc gaattcgttt gctcaatttg      840
ggagttgcga tattccaaag catgtagccg agtccatcac taaggttgcc accaaagagc      900
acgatgttga cataatggta aaaaggggtg aagtgaccgt tcgtgttgtg actctcaccg      960
aaactatttt tataatatta tctagattgt ttggtttggc ggtgtttttg ttcatgatat     1020
gtttaatgtc tatagtttgg ttttggatc atagataacc taggaaattt aaattaatc     1080
ctggttttat atgtactact gttgtagctg aaatttaggt cttcttgctg aatttatttc     1140
tgtttcgttt tcaactgtat tcaggggatc ctaggttatc tatgatacca aaaccaaact     1200
atagacatta aacatatcat gaacaaaaac accgccaaac caaacaatct agataatatt     1260
ataaaaaatag tttcgggtgag agtcacaaca cgaacggtca cttcacccct ttttaccatt     1320

```

```

atgtcaacat cgtgctcttt ggtggcaacc ttagtgatgg actcggctac atgctttgga 1380
ataticgcaac tcccaaattg agcaaacgaa ttcgcggcca tgatacagcc gctccccctta 1440
aaaattgctc ccgcatagct ggacgcttta acatcgttgc tgaaaaacgg tgagtacaac 1500
atactgacaa caacacaacc ggcaactatg tacaatacaa tattagataa atctacttta 1560
accacaagca ccatacaaaa tccataccac gagcttcacc aaaaagggtg tgaacgcaaa 1620
aagcgagctc agcataagta tttctatggt atagtcttc aacaagtacc agacggtgca 1680
agagagtgcc catatcgcgt aagaccataa taatatggtc cattctaata tcgattttag 1740
gactctcccg tagctttctc tcgctttcag cacaccatac tgaaaggaac tttttaaact 1800
ctgcttcacc gcgagagaaa atttctctgc ggcgtttag cctctcccc agatctctgc 1860
ctgaatttcg gcaaggtaa aatcttttaa cgtctttct ggggggact cgtaagtcaa 1920
tgttgcgagt gctgggtaac acggctccgc agtaattgta gaacctggcc agtcgtaaag 1980
actggcgttt cccgggagcg taaataaagc tcccggggtc gagctgctta ctgagcagca 2040
aaggcagagc agcgagaaga gaacgaatac agttttcatt ctcaaaagtt acgagcggta 2100
aatgattcgt aagaaaatac gcggtgttta aaactcgtc tgtagctgtt agcggtcggt 2160
tcaacgaaca agtgaaactg tttgttttaa gctgaaattg catagactgc tagatcctcg 2220
ctggtttctt ttg 2233

```

<210> 17

<211> 720

<212> ADN

<213> Vírus do amarelecimento suave da beterraba

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(720)

<223> Proteína P0 de BMV

<400> 17

atg caa ttt cag ctt aaa aca aac agt ttc act tgt tcg ttg aac cga 48
 Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg
 1 5 10 15

ccg cta aca gct aca gag cga gtt tta aac acc gcc tat ttt ctt acg 96
 Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr
 20 25 30

aat cat tta ccg ctc gta act ttt gag aat gaa aac tgt att cgt tct 144
 Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser
 35 40 45

ctt ctc gct gct ctg cct ttg ctg ctc agt aag cag ctc gac ccc ggg 192
 Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly
 50 55 60

agc ttc att tac act ccc ggg aaa cgc cag tct tta cga ctg gcc agg 240
 Ser Phe Ile Tyr Thr Pro Gly Lys Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg
 65 70 75 80

ttc tac aat tac tgc gga gcc gtg tta ccc agc act cgc aac att gac 288
 Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp
 85 90 95

tta cga gtg ccc ccc aga aaa gac gtt aaa aga ttt tac ctt gcc cga 336
 Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg
 100 105 110

aat tca gcc aga gat ctg ggg gag agg cta caa cgc cgc aga gaa att 384
 Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Ile
 115 120 125

ttc tct cgc ggt gaa gca gag ttt aaa aag ttc ctt tca gta tgg tgt 432
 Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys
 130 135 140

gct gaa agc gag aga aag cta cgg gag agt cct aaa atc gat att aga 480
 Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg
 145 150 155 160

atg gac cat att att atg gtc tta cgc gat atg gcc act ctc ttg cac 528
 Met Asp His Ile Ile Met Val Leu Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His
 165 170 175

cgt ctg gta ctt gtt gaa gaa cta tac cat aga aat act tat gct gag 576
 Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu
 180 185 190

ctc gct ttt tgc gtt cac cac ctt ttt ggt gaa gct cgt ggt atg gat 624
 Leu Ala Phe Cys Val His His Leu Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp
 195 200 205

ttt tgg cgg ttg gct aac ttc cct ggt aaa tgg ttt att tgc tct cac 672
 Phe Trp Arg Leu Ala Asn Phe Pro Gly Lys Trp Phe Ile Cys Ser His
 210 215 220

gaa atg tat ttt gaa aac tct ttc atc cag aaa gag cta cgt ttg tga 720
 Glu Met Tyr Phe Glu Asn Ser Phe Ile Gln Lys Glu Leu Arg Leu
 225 230 235

<210> 18

<211> 239

<212> PRT

<213> Vírus do amarelecimento suave da beterraba

<400> 18

Met Gln Phe Gln Leu Lys Thr Asn Ser Phe Thr Cys Ser Leu Asn Arg
 1 5 10 15
 Pro Leu Thr Ala Thr Glu Arg Val Leu Asn Thr Ala Tyr Phe Leu Thr
 20 25 30
 Asn His Leu Pro Leu Val Thr Phe Glu Asn Glu Asn Cys Ile Arg Ser
 35 40 45
 Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Leu Leu Ser Lys Gln Leu Asp Pro Gly
 50 55 60
 Ser Phe Ile Tyr Thr Pro Gly Lys Arg Gln Ser Leu Arg Leu Ala Arg
 65 70 75 80
 Phe Tyr Asn Tyr Cys Gly Ala Val Leu Pro Ser Thr Arg Asn Ile Asp
 85 90 95
 Leu Arg Val Pro Pro Arg Lys Asp Val Lys Arg Phe Tyr Leu Ala Arg
 100 105 110
 Asn Ser Gly Arg Asp Leu Gly Glu Arg Leu Gln Arg Arg Arg Glu Ile
 115 120 125
 Phe Ser Arg Gly Glu Ala Glu Phe Lys Lys Phe Leu Ser Val Trp Cys
 130 135 140
 Ala Glu Ser Glu Arg Lys Leu Arg Glu Ser Pro Lys Ile Asp Ile Arg
 145 150 155 160
 Met Asp His Ile Ile Met Val Leu Arg Asp Met Gly Thr Leu Leu His
 165 170 175
 Arg Leu Val Leu Val Glu Glu Leu Tyr His Arg Asn Thr Tyr Ala Glu
 180 185 190
 Leu Ala Phe Cys Val His His Leu Phe Gly Glu Ala Arg Gly Met Asp
 195 200 205
 Phe Trp Arg Leu Ala Asn Phe Pro Gly Lys Trp Phe Ile Cys Ser His
 210 215 220
 Glu Met Tyr Phe Glu Asn Ser Phe Ile Gln Lys Glu Leu Arg Leu
 225 230 235

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 9113159 A [0008]
- EP 1169463 B1 [0008]
- WO 2007128755 A [0013]

Documentos de não patente citados na descrição

- CARMEN SIMON-MATEO et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, vol. 1809 (11-12), 722-731 [0014]
- A. KOZŁOWSKA-MAKULSKA et al. *Journal of General Virology*, 2010, vol. 91 (4), 1082-1091 [0015]
- PU YAN et al. *Journal of Virological Methods*, 2010, vol. 166 (1-2), 101-105 [0016]

REIVINDICAÇÕES

1. Uma construção de ARN compreendendo uma sequência de segmentos *sense* e uma sequência de segmentos *antisense* tendo sequências deduzidas a partir do gene P0 do genoma BMYV ou de um gene ortólogo, em que a referida sequência de segmentos *sense* e a referida sequência de segmento *antisense* compreendem ambas um fragmento de nucleótidos tendo a sequência que partilha pelo menos 85 % de identidade de sequência com o gene P0 (SEQ.ID.NO:17) do genoma BMYV ou de um gene ortólogo.
2. A construção de ARN de acordo com a reivindicação 1, em que a(s) sequência(s) de segmentos *sense* e/ou segmentos *antisense* compreende(m) ainda um fragmento de nucleótido tendo a(s) sequência(s) que partilha(m) pelo menos 85 % de identidade de sequência com a sequência não traduzida de extremidade 5' (UTR 5') adjacente à sequência de nucleótidos de gene P0 do genoma BMYV.
3. A construção de ARN de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações, em que as sequências de segmentos *sense* e segmentos *antisense* compreendem um fragmento de nucleótido tendo sequências que partilham pelo menos 85 % de identidade de sequência com o gene P0 do genoma BMYV.
4. A construção de ARN de acordo com a reivindicação 3, em que as sequências de segmentos *sense* e segmentos *antisense* compreendem ainda um fragmento de nucleótidos tendo sequências que partilham pelo menos 85 % de identidade de sequência com o gene P1 do genoma BMYV.
5. A construção de ARN de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações, em que o segmento *sense*

compreende ou consiste na sequência SEQ.ID.NO:1 e/ou o segmento *antisense* compreende ou consiste na sequência SEQ.ID.NO:3.

6. A construção de ARN de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as sequências de segmentos *sense* e segmentos *antisense* compreendem ambas ainda um fragmento de nucleótido que partilha pelo menos 85 % de identidade de sequência com o genoma BNYVV e preferencialmente em que o referido segmento *sense* compreende um fragmento de SEQ.ID.NO:5 e o referido segmento *antisense* compreende um fragmento de SEQ.ID.NO:6.

7. A construção de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações, em que o(s) segmento(s) e o(s) fragmento(s) compreende(m) mais de 10 nucleótidos, preferencialmente entre 15 e 25 nucleótidos.

8. Uma construção de ADN que pode ser transcrita na construção de ARN de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 7.

9. Um vetor compreendendo a sequência de nucleótidos da construção de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 8.

10. Uma molécula de ARN autocomplementar bicatenário expressada através da construção de ADN de acordo com a reivindicação 8 ou o vetor de acordo com a reivindicação 9.

11. Um método para a indução de tolerância ou resistência, preferencialmente resistência total, pelo menos ao vírus BMV e possivelmente a outro vírus, numa planta ou numa célula de planta, o referido método compreendendo as etapas de: preparação da construção de ácido nucleico de acordo

com qualquer uma das anteriores reivindicações 1 a 9, ligada de modo funcional a uma ou mais sequências reguladoras ativas na planta ou na célula de planta, e a transformação da célula de planta com a construção de ácido nucleico, induzindo assim a resistência pelo menos ao vírus BMV na planta ou na célula de planta.

12. O método de acordo com a reivindicação 11, em que o outro vírus é selecionado a partir do grupo que consiste em Vírus do mosaico amarelo do nabo, Vírus do amarelo transmitido pelo pulgão da cúrcuma, Vírus do enrolamento da folha da batata, Vírus da folha amarela da cana-de-açúcar, Vírus do Mosaico da Enação da Ervilha, Vírus do amarelo da beterraba ocidental-E.U.A., Vírus da clorose da beterraba, Vírus do nanismo amarelo do cereal e vírus BNYVV, preferencialmente o vírus BNYVV.

13. Um método para a indução de tolerância pelo menos ao vírus BMV compreendendo a etapa de preparação de uma construção de ácido nucleico compreendendo um segmento *sense* e um segmento *antisense* deduzidos a partir de uma sequência de nucleótidos BNYVV, sendo preferencialmente deduzidos a partir do gene que codifica a proteína P15 do referido BNYVV.

14. Uma planta transgênica ou uma célula de planta transgênica tolerante ou resistente, de preferência totalmente resistente pelo menos ao vírus BMV e possivelmente a um ou mais outros vírus e compreendendo uma construção de ácido nucleico capaz de expressar a sequência de nucleótidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, preferencialmente a construção de ADN de acordo com a reivindicação 8, ligada de modo funcional a uma ou mais sequências reguladoras ativas na planta ou na célula de planta, e/ou compreendendo um vetor de acordo com

a reivindicação 9, e/ou compreendendo uma molécula de ARN autocomplementar bicatenário de acordo com a reivindicação 10.

15. A planta transgênica ou célula de planta transgênica de acordo com a reivindicação 14 selecionada a partir do grupo que consiste em alface, pepino, batata, cana-de-açúcar, ervilha, cevada e beterraba, sendo preferencialmente uma beterraba ou uma célula de beterraba.

16. Um tecido de planta transgênica e/ou uma estrutura reproduzível derivados da célula de planta transgênica de acordo com as reivindicações 14 ou 15, em que o referido tecido é selecionado a partir do grupo que consiste em fruto, caule, raiz, tubérculo e semente, ou em que a referida estrutura reproduzível é selecionada a partir do grupo que consiste em calos, rebentos ou embriões.



FIG. 2A

Intrão de heterrraha
(91bp)

CAAAAGAAACCGAGGATCTAGCAATTCAGCTTAAACAACA
 GTTCACTTGTCGTTGAACCGACCGCTAACAGCTACAGAGCGATTTAAACAC
 CCGTATTTTCTTACGAATCATTTACCCCTGGTAACCTTTGAGAAATGAAACTGTA
 TTCGTTCTTCTCGCTCTGCTTGGCTCAGTAAAGCAGCTGACCCCGGG
 AGCTTATTTACGCTCCCGGAAAGGCCAGTCTTTACGACTGGCCAGGTTCTACA
 ATTACTGGGAGCCGGTTACCCAGCACTGGCAACATGACTTACGAGTGCCTCC
 CAGAAAAGACGTTAAAAGATTTTACCTTGGCCGAATTCAGGCAGAGATCTGGG
 GGAGAGCTACAAACCGCCGAGAGAAAATTTCTCCCGGGAAGCAGAGTTTAA
 AAAGTTCCTTTCAGTATGGGTGCTGAAAGCCGAGAGAAAGCTACGGGAGAGTCT
 AAAATCGATATTAGAATGGACCAATATTATTATGGTCTTACCGGATATGGGCATC
 TCTTGCACCGTCTGGTACTTGTGAAGAACAATAACCATAGAAAATACCTTATGCTGA
 GCTGGCTTTTTCGCTCACCACTTTTGGTGAAGCTCGTGGTATGGATTTTGGCT
 AGGAATTTAATAATCTGGTTTTAATGTACTACTGTGTAGCTGAAATTT
 AGGCTTCTGTGCAATTTATTTCTGTTTCTGTTTCTACGTATTCAGGGGATC
 CTAGCCAAAATCCATACCAGGCTTACCCTCAACCAAAAGGTGGTGAACCCAAA
 AGCGAGCTCAGCATAAGTATTTCTATGGTATAGTCTTCAACAAGTACCAGA
 CCGTGCAAGAGAGTCCCAATATCGGTAAGACCAATAATATAATGGTCCATTC
 TAAATCGATTTTAGGACTCTCCCGTAGCTTCTCCGTTTCAGCACACCAAT
 ACTGAAAAGGAACTTTTTAAACTCTGCTTACCCTGAGAGAAAATTTCTCTGC
 GCGTTGTAGCTCTCCCTCCAGATCTCTGCTGAAATTCGGGCAAGGTAATAA
 TCTTTAAACGCTTTTCTGGGGCCACTCGTAAGTCAATGTTGGAGTGTCTG
 GGTAACACGGCTCCGCAATAATTGTAGAACTGGCCAGCTGTAAGAAGACTGG
 CGTTTCCCGGAGCGTAATAAAGCTCCCGGGTCGAGCTTACTGAGC
 AGCAAAGGCAGAGCAGAGAGACAGAACGATACAGTTTCTATTCACAAA
 GTTACGAGCGGTAATGATTCGTAAGAAAATACCGGTGTTTAAACTCCGCT
 CTGTAGCTGTAGCGTCCGGTTCAACCGAACAGTGAACCTGTTGTTTAAAG
 CTGAAAATGCAATAGACTGCTAGATCCCTGGCTGGTTCCTTTT

P0 sense

Intrão de heterrraha

P0 antisense

FIG. 2B

Fig. 2

Gama de Sequência: 1 a 659

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAAARGAAACCAGCGAGGATCTAGCAGTCTATGCAATTTTCAGCTTAAACAACAACAGTTTCACCTTGTTGAAACCGACCGCTAACAGCTACAGAGCGAG
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TTTTAAACACCGCGTATTTCTTACGAATCATTTACCGCTCGTAACCTTTTGAGAAATGAAAACGTGATTCGTTCTCTTCGGCTGCTGCGCTTTGCTGCT
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
CAGTAAGCAGCTCGACCCCGGAGCTTTATTTACGCTCCCGGAAACGCCAGTCTTTACGACTGGCCAGGTTCTACAATTACTCGGAGCGGTGTTACCC
310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
AGCACTCGCAACATTGACTTACGAGTGCCTCCCGAAAGACGTTAAAGATTTTACCTTGGCCGAAAATTCAGGGCAGAGATCTGGGGGAGAGGCTACAAC
410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
GCCGCAGAGAAAATTTCTCTCGCGGTGAAGCAGAGTTTAAAAGTTCCTTTTCAGTATGGTGTGCTGAAAGCGAGAGAAAGCTACGGGAGAGTCTCTAAAAT
510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CGATATTAGAATGGACCATATTATTATGGTCTTACGGCATATGGCAGTCTCTTGCACCGTCTGGTACTTGTGGAAGAATATACCATAGAAAATACTTAT
610     620     630     640     650
GGTGAGCTCGCTTTTGGGTTCAACCACCTTTTGGTGAAGCTCGTGGTATGGATTTTG

```

Fig. 3

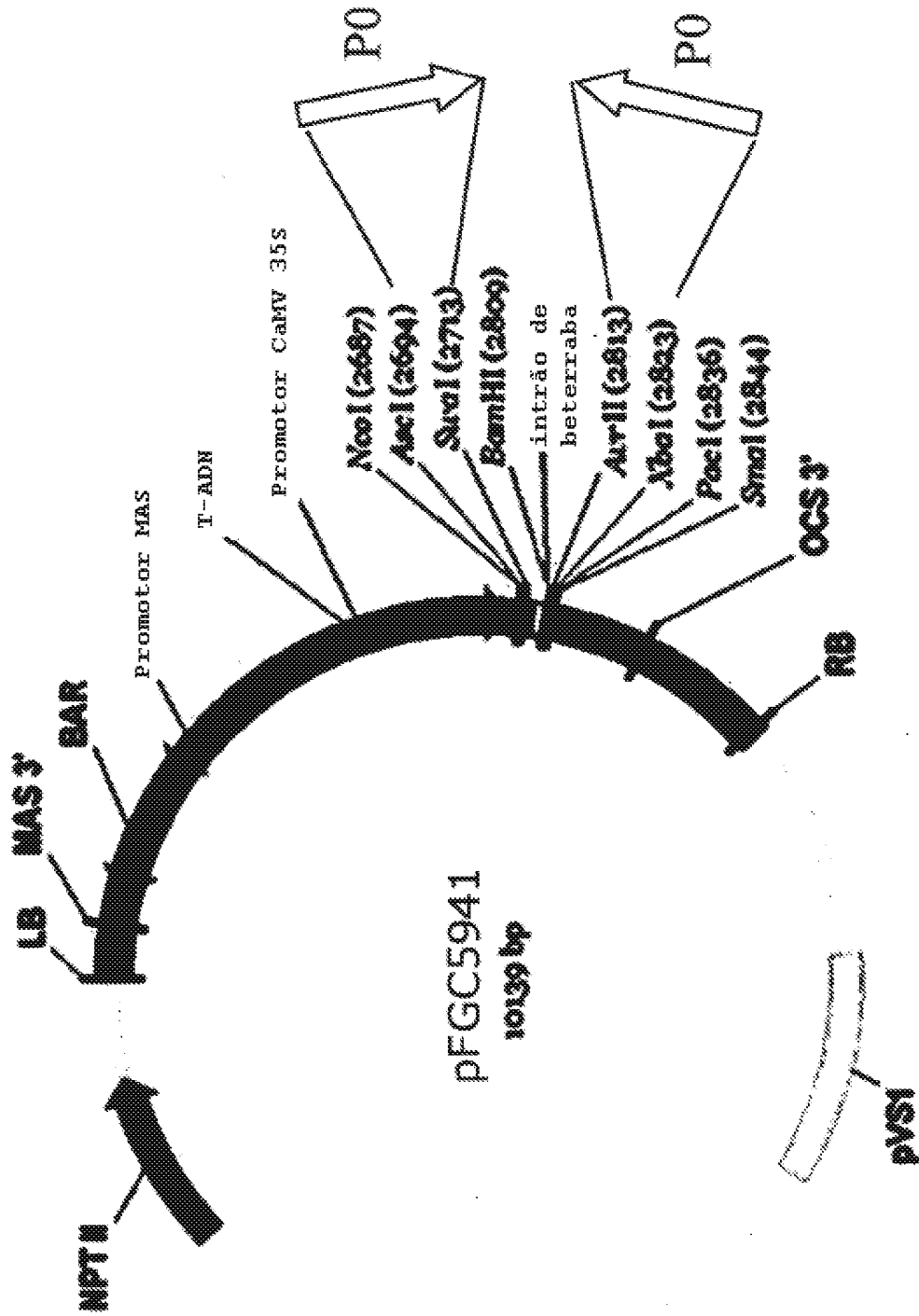


Fig. 4A

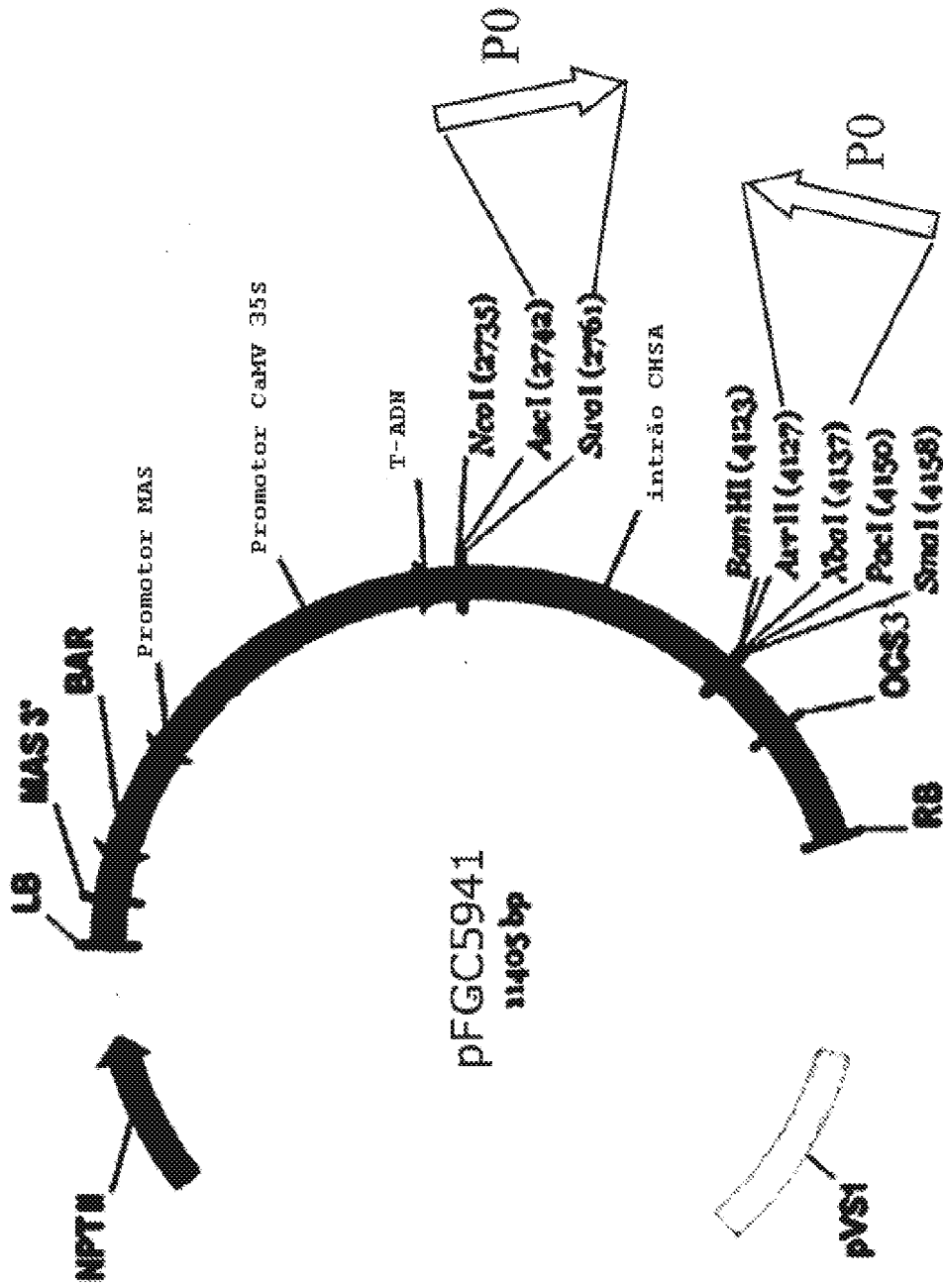


FIG. 4B

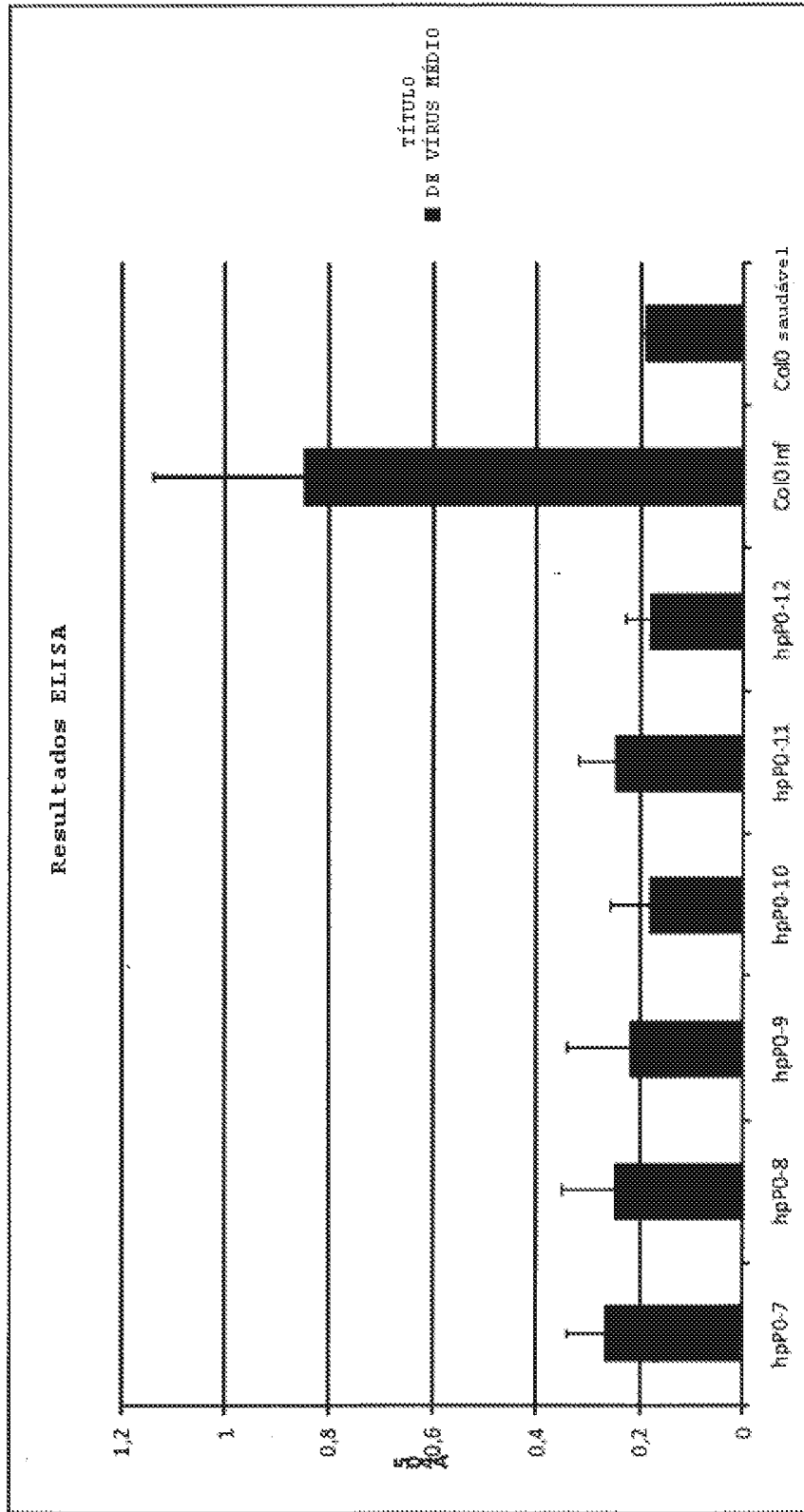


Fig. 5

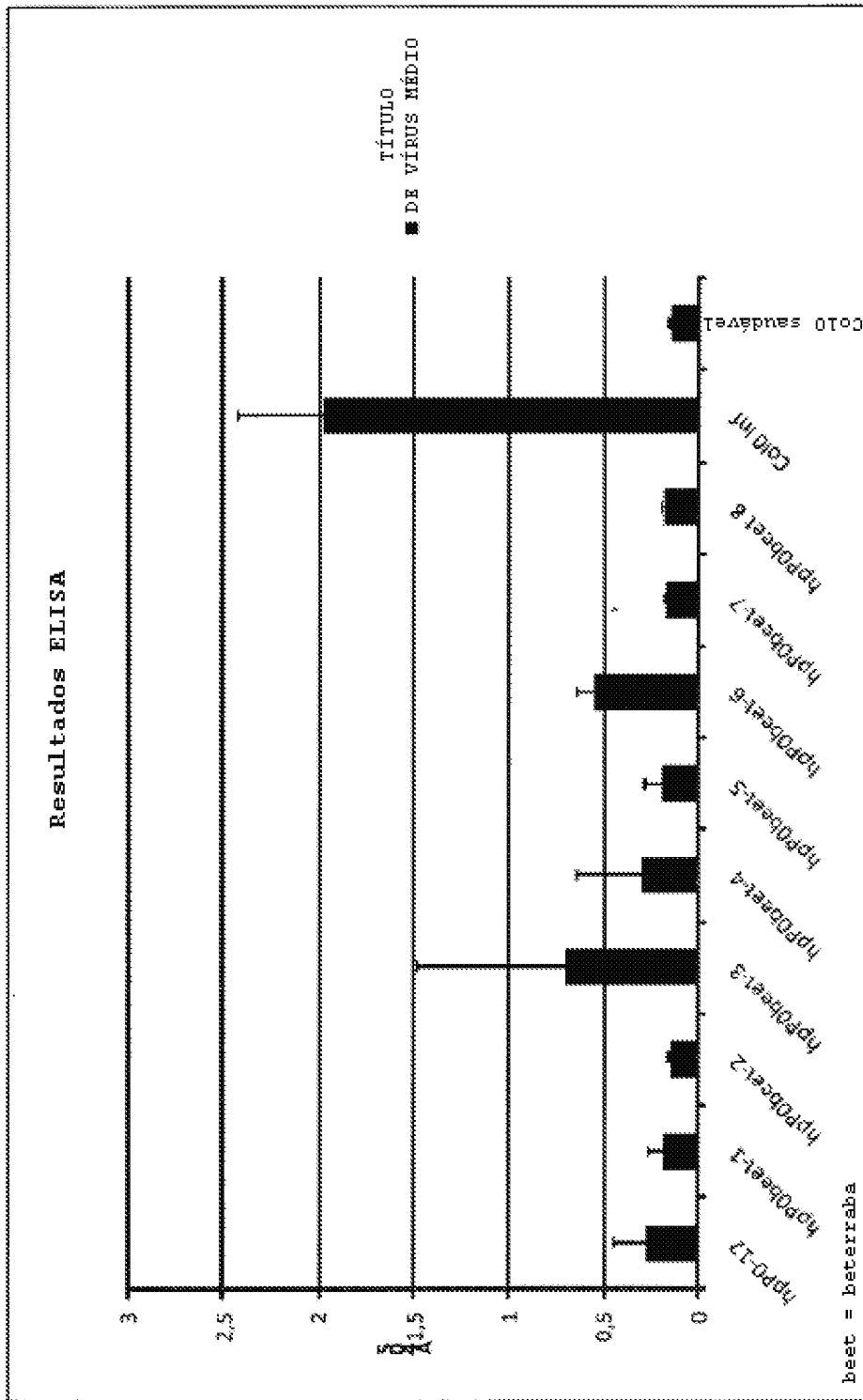


Fig. 6

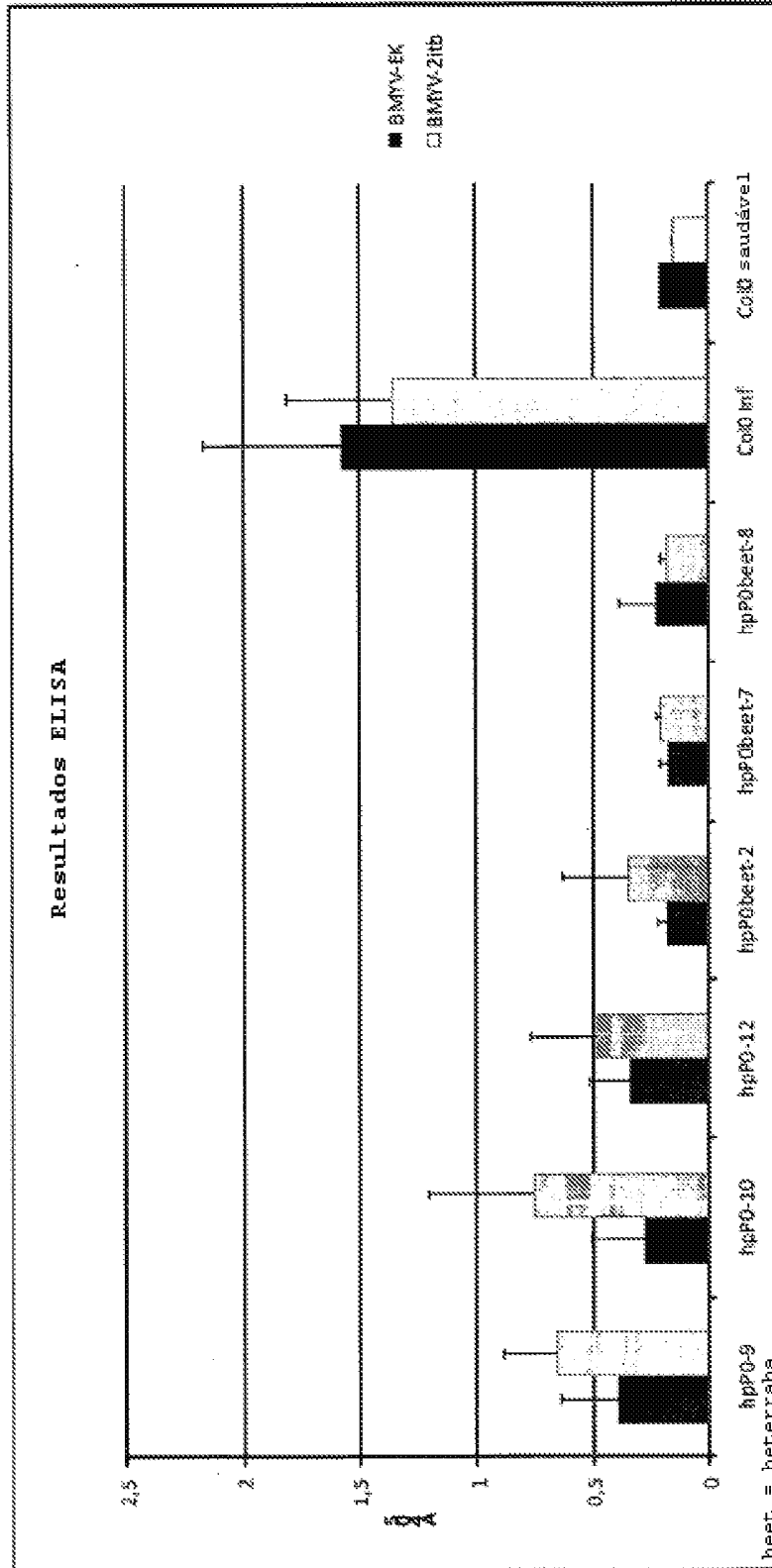


Fig. 7

Gama de Sequência: 1 a 720

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 ATGCAATTCAGCTTAAACCAACAGTTTCACCTTGTTGTAACCGACCGTAAACAGAGGAGTTTAAACACCGCGTATTTCTTACGAATC
 M Q F Q L K I N S F T C S L N R P L T A T E R V L N T A Y F L T N
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 ATTACCGCTCGTAACTTTTGAGAAATGAAAACCTGATTTGGTCTCTCTGCTGCTTTGGCTCAGTAAGCAGCTCGACCCGGGAGCTTTAT
 H L P L V T F E N E N C I R S L L A A L P L L L S K Q L D P G S F I
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 TTACGCTCCGGGAACCCAGTCTTTACGACTGGCCAGGTTCTACAATTACTCGGGAGCCGTTACCCAGCACTCCCAACATTGACTTACGAGTCCCC
 Y A P G K R Q S L R L A R F Y N Y C G A V L P S T R N I D L R V P
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 CCCAGAAAGACGTTAAAGATTTTACCTTGCCTCCGAAATTCAGGCAGAGATCTGGGGGAGGGTACACGCCCGCAGAGAAATTTTCTCGCGGTGAAG
 P R K D V K R F Y L A R N S G R D L G E R L Q R R R E I F S R G E
 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 CAGAGTTTAAAGTTCCTTTGATGGTGTGCTGAAGCGAGAGAAAGTACGGGAGAGTCTTAATAATCGATATTAGAAATGGACCATATTATTATGGT
 A E F K K F L S V W C A E S E R K L R E S P K I D I R M D H I I M Y
 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
 CTTACGGATATGGGACCTCTTTGCACCCGTCGGTACTTGTGAAGAACTATACCATAGAATACTTATGCTGAGCTCGCTTTTGGCTTACCACCTT
 L R D M G T L L H R L V L V E E L Y H R N T Y A E L A F C V H H L
 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700
 TTGGTGAAGCTCGTGGTATGGATTTTGGGCTGACTCCCTGGTAAATGGTTTATTTGGCTCAGCAATGTATTTTGAAAACCTTTTCATCC
 F G E A R G M D F W R L A N F P G K W F I C S H E M Y F E N S F I
 710 720
 AGAAAAGACTACGTTTGTGA
 Q K E L R L *

Fig. 8

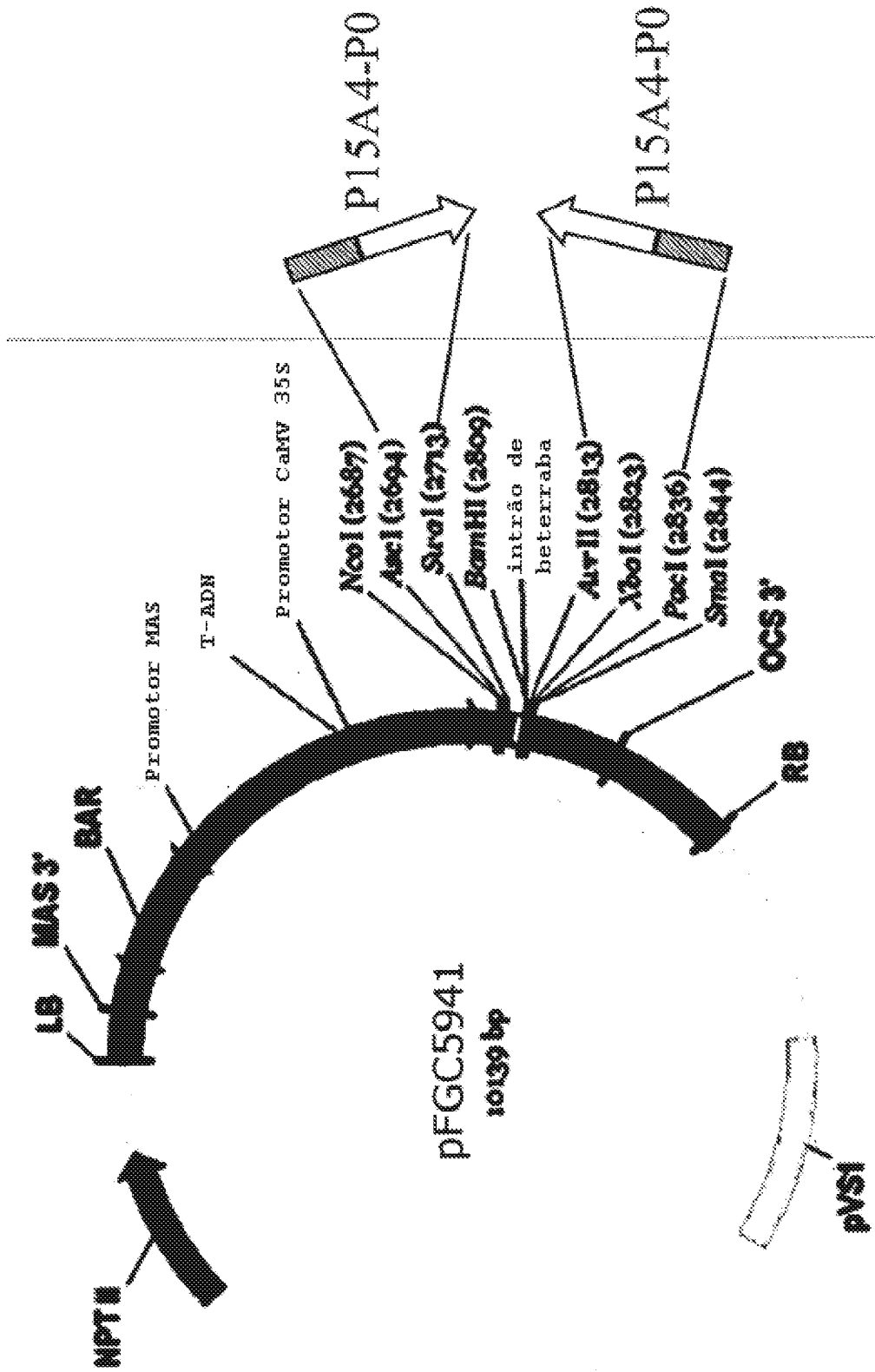


Fig. 11A

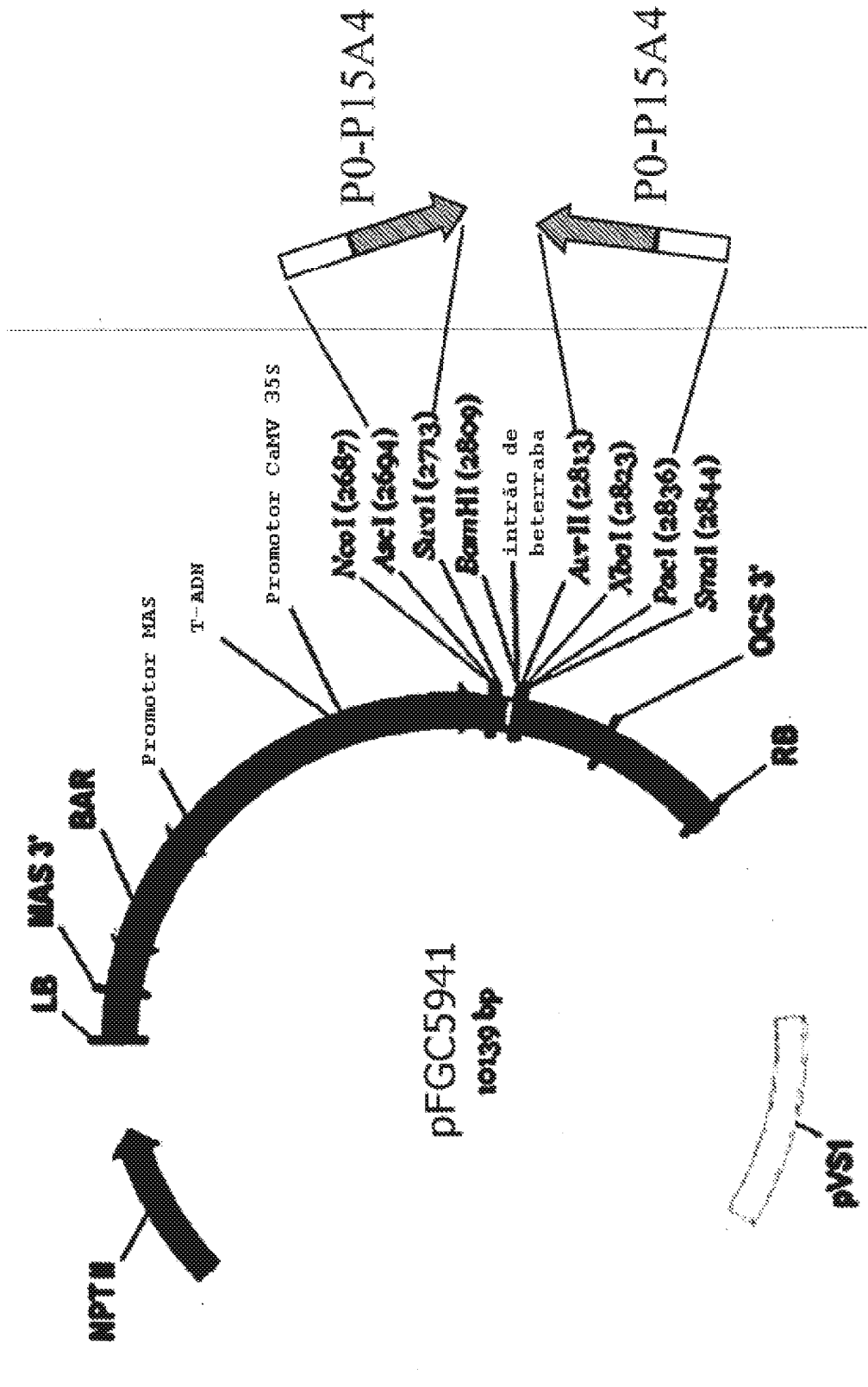


Fig. 11B