

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

(21) BR 10 2012 033506-9 A2

(22) Data de Depósito: 28/12/2012

(43) Data da Publicação: 26/08/2014
(RPI 2277)



(51) Int.Cl.:

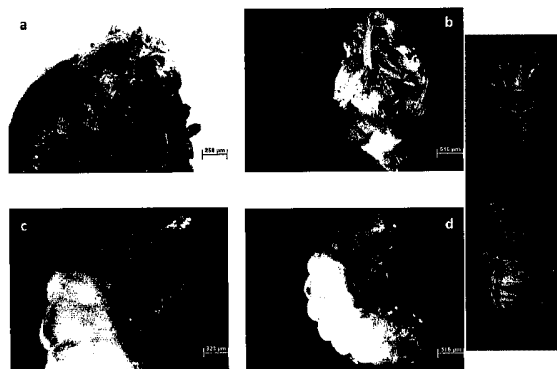
C12N 15/82
C12N 15/113
C12N 5/10
A01H 5/00
A01N 65/08
A01P 7/00

(54) Título: MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DA FAMÍLIA DA LACASE

(73) Titular(es): EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Alexandre Augusto Pereira Firmino, Diogo Martins de Sá, Isabela Tristan Lourenço, Leonardo Lima Pepino de Macedo, Maria Cristina Mattar da Silva, Maria Fátima Grossi de Sá, Roberta Ramos Coelho

(57) Resumo: MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DA FAMÍLIA DA LACASE. A presente invenção está relacionada ao controle de infestação de praga através da inibição ou redução da expressão de genes da família da lacase. A invenção provê ainda métodos e composições para o controle de pragas, através da alimentação de uma ou mais moléculas de RNA de fita dupla provida pela presente invenção. A invenção descreve ainda um método de obtenção de plantas transgênicas que expressam moléculas de RNA de fita dupla. A presente invenção é preferencialmente utilizada para plantas de algodoeiro.



Relatório de Patente de Invenção: “MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DA FAMÍLIA DA LACASE”.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga que atacam lavouras agrícolas, especialmente algodoeiros, através do silenciamento de genes da família da lacase mediado por RNA dupla fita (dsRNA) expresso em plantas de algodão.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 A produção agrícola mundial tem recebido especial atenção no início do século XXI. A crescente demanda por alimentos e produtos agrícolas e as previsões do aumento da população mundial nas próximas décadas exige o desenvolvimento de metodologias e processos sustentáveis que venham ajudar a suprir essa demanda ao elevar a produção agrícola, principalmente nos países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina.

15 No Brasil, o agronegócio é o mais importante setor da economia nacional, sendo responsável por mais de um terço do PIB, por 37% dos empregos gerados no país e 41% das nossas exportações em 2012 de acordo com o Ministério da Agricultura.

20 Apesar da aplicação de mais de 2,5 milhões de toneladas de pesticidas em todo mundo, estima-se que mais de 25% de todo o potencial produtivo ainda é perdido devido ao ataque de pragas, incluindo insetos, ervas-daninhas e fitopatógenos antes da colheita. Para algumas *commodities* como arroz, batata e milho, essa perda varia entre 30 e 40%. Além das perdas, o uso de pesticidas representa um custo de mais de 10 bilhões de dólares por ano. O controle de pragas com agentes químicos diminuiu bastante os danos causados por insetos e patógenos nas ultimas cinco décadas. Porém, o uso indiscriminado, extensivo e contínuo de pesticidas químicos pode resultar na degradação do meio ambiente, em efeitos danosos à saúde humana e
25 de outros organismos, além de prejudicar organismos não alvo e levar à seleção de populações de pragas resistentes.

Neste contexto, a biotecnologia é uma área que tem se destacado na promissora tarefa de prover novos produtos, processos e metodologias para aumentar a produção agrícola, não só com o desenvolvimento de insumos, mas também de variedades resistentes a estresses abióticos como temperatura, seca, salinidade, e estresses bióticos, como ataque de pragas e incidência de doenças.

Ferramentas de engenharia genética trouxeram à humanidade um poder de manipular e desenvolver novos genótipos de plantas sem precedentes, além de trazer uma promissora via para uma agricultura mais segura e sustentável. Genes de plantas e outros organismos, envolvidos em vias de sinalização reguladoras de processos fisiológicos importantes têm sido clonados e transferidos para plantas de interesse agrônomo, conferindo novas características economicamente importantes para o aumento de sua produção.

Neste sentido, o uso de plantas geneticamente modificadas (GM) para controle de insetos tem sido um dos métodos mais eficientes nos últimos anos. Desde o início da adoção desta tecnologia em 1996, foi observado um aumento de 1,7 milhões para 160 milhões em 2011, fazendo desta tecnologia a mais rapidamente adotada na história da agricultura moderna (JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011 ISAAA Brief No.43. ISAAA: Ithaca, NY, v. 43, 2011. ISSN 978-1-892456-52-4). De acordo com o *Center for Environmental Risk Assessment* (CERA - Washington, DC) que monitora a liberação mundial de variedades GM, 59 cultivares – milho, soja, algodão, tomate e batata - desenvolvidas para resistência a insetos são plantadas atualmente nos mais diversos países (CERA, C. F. E. R. A. GM Crop Database. Washington, DC USA, June 2012 2012. Disponível em: < <http://cera-gmc.org/> >. Acesso em: 10-07-2012). Cultivares de algodão resistentes a larvas de lepidópteros e cultivares de milho resistentes a lepidópteros e coleópteros têm sido utilizados na agricultura mundial, reduzindo o uso de pesticidas e diminuindo os custos de produção (JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011 ISAAA Brief No.43. ISAAA: Ithaca, NY, v. 43, 2011. ISSN 978-1-892456-52-4). O uso da engenharia genética trouxe algumas vantagens em relação aos métodos de genética clássica. Além de aumentar a busca de potenciais genes envolvidos em características de interesse, proporciona a introdução de um número de genes diferentes numa mesma planta, reduzindo o tempo de introgressão de características desejadas em um evento genético elite.

Sendo assim, a introdução de genes envolvidos na resposta de outras plantas ao inseto, ou genes que codificam proteínas inseticidas, ou ainda cujo produto interfira no desenvolvimento do inseto-praga pode ser um caminho mais eficiente e rápido para melhorar variedades comerciais.

5 A cultura do algodão é a mais importante das culturas de fibras têxteis, sendo o algodoeiro uma das espécies vegetais mais cultivadas no mundo. Além dos produtos primários do algodão (pluma, caroço e fibrila), a cadeia produtiva produz linter, fios, tecidos, malhas, torta, farelo, óleo bruto e biodiesel à base de algodão e movimenta bilhões de dólares no comércio mundial (NEVES, M. F.; PINTO, M. J. A. A CADEIA DO ALGODÃO
10 BRASILEIRO: DESAFIOS E ESTRATÉGIAS. Brasília - DF: Markestrat, 2012).

No Brasil, a cultura do algodão está classificada entre as dez principais culturas agrícolas. No cenário mundial, o país se destaca: é o quarto maior produtor do mundo.

Apesar de uma sutil diminuição na produção ser devida a problemas climáticos, a produção de algodão no Brasil é bastante afetada pela ação de pragas e doenças que fazem
15 com a qualidade dos produtos agrícolas derivados da cotonicultura seja prejudicada, afetando não só o setor primário (produção), mas também o secundário (industrialização, comercialização e exportação) e terciário (serviços).

Pragas, doenças e ervas daninhas de difícil controle, além de causarem danos às plantas de algodão, aumentam o custo da produção devido ao grande uso de defensivos agrícolas. A
20 redução dos custos com defensivos agrícolas depende do desenvolvimento, transferência e utilização de tecnologias mais eficientes no combate a pragas, doenças e ervas daninhas.

Existem no Brasil 20 pragas de importância econômica para o cotonicultor e 5 pragas ocasionais, além de 15 doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (FREIRE, E. C. Algodão no Cerrado. 2a Edição Revisada. Brasília - DF: ABRAPA - Associação
25 Brasileira dos Produtores de Algodão, 2011). Os principais insetos-praga que infestam a cultura do algodão são a lagarta da maçã – *Heliothis virescens* Fabr., 1781 (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta rosada – *Pectinophora gossypiella* Saund, 1844 (Lepidoptera - Gelechiidae), o curuquerê – *Alabama argillacea* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae), o bicudo do algodoeiro – *Anthonomus grandis* Boh., 1843 (Coleoptera: Curculionidae) e a
30 lagarta do cartucho do milho – *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera:

Noctuidae). No intuito de combatê-las, os produtores chegam a efetuar 30 aplicações de defensivos, em sua maioria direcionadas ao combate de pulgões, lagartas e do bicudo, sendo este último um dos grandes responsáveis pela queda da área produzida entre as décadas de 1980 e 1990, quando chegou a dizimar plantações inteiras em regiões do nordeste, do sudeste e do sul do Brasil.

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) é um dos insetos-praga mais importantes da cultura do algodão, sendo responsável por danos consideráveis na lavoura de vários países das Américas. É um inseto da ordem Coleoptera, família Curculionidae, que mede normalmente de quatro a nove milímetros de comprimento, de coloração castanho-ferruginosa quando adulto jovem e cinza quando se torna mais velho. Uma característica marcante, responsável pelo nome pelo qual o inseto é conhecido, é sua cabeça alongada para frente, que se prolonga em um rostro que tem metade do seu comprimento fino e recurvado. A variação do tamanho do bicudo é influenciada por uma série de fatores, como temperatura, umidade e quantidade de alimento no estágio larval.

Algumas características do ciclo de vida do bicudo dificultam o controle de sua população. Bicudos adultos podem hibernar durante o inverno (diapausa) em restos de cultura, lixo orgânico de fazendas e celeiros. Esta diapausa pode durar meses, por períodos variáveis de 150 a 180 dias até um novo ciclo da cultura. De cada 50 bicudos que entram em diapausa, estima-se que uma população de 500.000 adultos surgirá ao fim da próxima safra. Além disso, o inseto tem alta mobilidade, podendo voar alguns quilômetros, e alta tolerância aos seus inimigos naturais. A alimentação do bicudo é preferencial por plantas do gênero *Gossypium*. No entanto 104 espécies da família Malvaceae são atacadas pelo bicudo. Espécies como *Hibiscus* sp. são consideradas importantes para a manutenção da população do bicudo no período de entressafra do algodão.

Atualmente, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de gerar tecnologias econômica e ecologicamente viáveis para o controle desta praga. Estes incluem: (i) melhoramento clássico visando o desenvolvimento de cultivares com o ciclo curto e de rápida maturação, (ii) armadilhas de feromônios, e (iii) alternativas biológicas que incluem a utilização de agentes biológicos como bactérias, fungos e vírus que poderão ser utilizados por aspersão direta ou para manipulação e transformação de plantas de algodão.

Programas de melhoramento vegetal por meio de transgenia consistem numa via alternativa aos métodos convencionais para o controle de insetos-praga. Mais de 10 cultivares de plantas de algodão GM resistentes a insetos são comercializadas no mundo. No entanto, nenhuma delas apresenta resistência ao bicudo do algodoeiro e, portanto, não controlam a principal praga da cultura do algodão no Brasil.

As principais variedades transgênicas com efeitos entomotóxicos bem estabelecidos expressam toxinas do *Bacillus thuringiensis*. Atualmente especial foco tem sido dado à utilização de RNA de interferência (RNAi) para o controle de pragas (PRICE, D. R.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. Trends in Biotechnology, v. 26, n. 7, p. 393-400, 2008).

Esse processo, descrito primeiramente em plantas, foi denominado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) (JORGENSEN et al., 1996). Pouco tempo depois, o termo interferência mediada por RNA, ou apenas RNA interferente (RNAi) foi dado pelos pesquisadores Andy Fire e Craig Mello (FIRE et al., 1998) ao silenciamento de um gene específico de *C. elegans* para uma determinada sequência nucleotídica, causado pela aplicação de RNA de fita dupla (dsRNA) exógeno.

Passada pouco mais de uma década desde a descoberta do RNAi, os pequenos RNAs envolvidos em mecanismo de silenciamento por RNAi são definidos não só por seu tamanho (~ 20-30 nucleotídeos), mas também por sua associação com proteínas da família Argonauta (GHILDIYAL; ZAMORE, 2009; KETTING, 2011). A família das argonautas é caracterizada por proteínas que possuem os domínios conservados PAZ e PIWI. O domínio PAZ é a região específica de ligação a RNAs de fita dupla e o domínio PIWI é tem uma estrutura parecida com o domínio de clivagem RNase H.

Vários estudos utilizando RNA interferente para avaliação funcional de um determinado gene têm sido realizados nos mais diversos organismos. Estes estudos variam nos métodos de administração do dsRNA e de avaliação do efeito de silenciamento. Muitos trabalhos feitos com insetos visam estudar a função de um determinado gene para melhor compreensão de um processo fisiológico visando, na maioria das vezes, a uma aplicação biotecnológica. O uso de RNAi tem sido funcional em várias linhagens de células de insetos, ovos, larvas e adultos com o uso de vetores plasmidiais para expressar e sintetizar dsRNAs

que podem ser administrados por alimentação, injeção e até mesmo eletroporação, dessa forma causando silenciamento de genes-alvo e mudanças de fenótipo.

5 Apesar de muitos desses trabalhos visarem à análise da função dos genes para compreensão da biologia dos insetos, a maioria dos estudos, principalmente de lepidópteros, coleópteros e dípteros busca genes de interesse biotecnológico. Muito utilizado para a análise de expressão gênica, o RNA interferente vem se mostrando uma ferramenta promissora no auxílio ao controle de pragas. Seu mecanismo de ação baseia-se principalmente na introdução de um RNA dupla fita em um organismo alvo, por microinjeção ou ingestão (FIRE et al., 1998). Esse RNA dupla fita inicia um processo de silenciamento gênico pós-transcricional, 10 através da degradação de mRNAs homólogos, causando uma diminuição na síntese da proteína correspondente (MEISTER; TUSCHL, 2004), dificultando a sobrevivência ou até mesmo levando o inseto à morte.

Lacases (*p*-difenoil:dioxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2) são enzimas da família das multi-cobre oxidases, que inclui também as ascorbato oxidases, L-(ascorbato dioxigênio oxidoreductases, E.C.1.10.3.3) e as ferroxidases (Fe(II):dioxigênio oxidoreductase, E.C.1.16.3.1) (DITTMER, N. T.; KANOST, M. R. Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 3, p. 179-88, 2010.). São proteínas que contem átomos de cobre (Cu) que reduzem o oxigênio molecular formando 20 água e simultaneamente oxidam com a transferência de um elétron de vários substratos como difenóis, monofenóis metoxi-substituídos e aminas aromáticas e alifáticas. O principal papel das lacases descrito em insetos é na esclerotização da cutícula, apesar de atividades de lacase e processos de esclerotização possam ocorrer em casulos e ovos. Sua presença na cutícula e a atividade relacionada com a esclerotização foi primeiro descrita em 1969 (YAMAZAKI, 1969) e seu papel no processo tem sido estudado em insetos desde então (DITTMER, N. T.; 25 KANOST, M. R. Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40, n. 3, p. 179-88, 2010.). No entanto, poucos trabalhos foram publicados relacionados com mecanismos de ação e caracterização gênica e proteica destas enzimas. Um dos desafios para o estudo desta classe de enzimas em insetos é seu isolamento e purificação, principalmente sua solubilização. Métodos proteolíticos têm sido 30 utilizados para tentar solubilizar a enzima, mas não é desconhecido o grau de alteração nas

propriedades estruturais, cinéticas e físico-químicas em relação à proteína nativa em seu meio de atuação. A importância da lacase durante o desenvolvimento faz desta enzima um alvo potencial para uso biotecnológico no controle do inseto.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção está relacionada com um método para reduzir ou inibir a expressão de um gene de lacase em células eucarióticas, particularmente em células de insetos, resultando na morte, inibição, atrofia ou interrupção de alimentação de uma praga alvo.

Em uma concretização a invenção descreve moléculas de ácido nucleicos substancialmente similares às seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou 10 fragmentos ou complementos destas. A invenção descreve moléculas de dsRNA, a partir das seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas ou fragmento ou complemento desta, estabilizada ou a expressão de um ou mais microRNAs (miRNA) ou siRNAs para inibição da expressão de um gene-alvo, em coleóptero-praga, expressos destas seqüências e fragmentos das mesmas.

15 A invenção descreve ainda composições contendo moléculas de ácido nucleico substancialmente similar às seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas, para o controle de insetos-praga, particularmente o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*).

A invenção provê também um método para supressão de expressão gênica em um 20 coleóptero-praga, como o bicudo-do-algodoeiro ou espécie correlata, que compreende a etapa de fornecimento na dieta da praga de uma quantidade supressora do gene, contando com pelo menos uma molécula de dsRNA, transcrita de uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar às seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas, que tenha pelo menos um fragmento complementar de 25 uma seqüência do mRNA no interior das células da praga.

São também aspectos da invenção, genes quiméricos, construções gênicas contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção, vetores de transformação e expressão, células e organismos transgênicos, métodos para a expressão da molécula da presente invenção em organismos transgênicos, bem como o uso das mesmas no controle de pragas. A invenção

compreende, também, um método para obtenção de uma planta transgênica utilizando as construções gênicas da presente invenção e um método de produção de comida ou alimento, compreendendo a obtenção de uma planta transformada com polinucleotídeos contendo uma seqüência de nucleotídeos substancialmente similar às seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas, e o preparo de comida ou alimento a partir da referida planta ou parte da mesma.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1, Anexo 1. Pupas/Adultos observados 20 dias após microinjeção de dsRNA de lacase2A. É possível notar uma má-formação e menor pigmentação da cutícula na cabeça (a), e deformações no corpo, além da manutenção de um fenótipo pupo-larval (b, c,d) quando comparados com adultos normais (à direita).

Figura 2, Anexo 2. Comparação entre larvas normais de 3° instar (1 – a, c, e) e larvas observadas 20 dias após microinjeção de dsRNA de lacase2A (2 – b, d, f). Em f, é possível observar formação de estrutura que pode ser um ovipositor ou edeago, estrutura presente somente em adultos normais.

Figura 3. Esquema do bioensaio de bicudo com dsRNA de lacase 2 durante o ciclo de vida do inseto. A seta azul indica o momento da microinjeção e a seta vermelha, o momento da observação dos efeitos. Para mais esclarecimentos, vide texto.

Figura 4. Avaliação do efeito de dsRNA de lacase2 20 dias após a microinjeção. Em vermelho experimento feito com dsRNA de lacase2 e em azul, experimentos controle, feitos com H₂O bidestilada.

Figura 5. Comparação da quantidade de transcritos de lacase2 entre os insetos-controle e as pupas/adultos (A) ou larvas (B) após a microinjeção com dsRNA. Os genes de referência utilizados foram *gapdh* e *β-tubulina*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve métodos e composições para o controle de pragas, especialmente pragas de algodão. Por exemplo, a presente invenção fornece tecnologias de DNA recombinante para reprimir ou inibir pós-transcricionalmente a expressão de uma
5 sequência alvo na célula de uma praga. Esse efeito é obtido através da alimentação, para uma ou mais pragas, de cadeia dupla de RNA ou de fragmentos de RNA (miRNA ou siRNA) transcritos a partir de toda ou uma parte de uma sequência alvo que codifica, controlando assim a infestação. Por conseguinte, a presente invenção refere-se a sequências específicas de inibição da expressão de sequências de codificação, utilizando RNA de cadeia dupla (dsRNA),
10 incluindo pequeno RNA interferente (siRNA), para atingir os níveis pretendidos de controle de pragas.

A presente invenção proporciona um método de inibição da expressão de um gene alvo em coleópteros. Em certas formas de realização, o método compreende a modulação ou inibição da expressão de um ou mais genes-alvo de coleópteros que faz com que ocorra
15 inibição do desenvolvimento, reprodução e/ou infeciosidade e, eventualmente, resulte na morte do inseto. Mais especificamente a presente invenção está relacionada à inibição do gene da lacase em coleópteros, resultando na interrupção do desenvolvimento e má formação de insetos larvas e adultos, podendo resultar na morte do inseto. O método compreende a introdução de RNA dupla fita (dsRNA) de forma parcial, estabilizado, incluindo as suas
20 formas modificadas, tais como sequências de pequeno RNA interferente (siRNA), dentro das células ou em meio extracelular, tal como o intestino médio ou cutícula, dentro de coleópteros em que o corpo de dsRNA entra nas células e inibe a expressão de pelo menos um ou mais genes alvo, e onde a inibição exerce um efeito deletério sobre a praga. Os métodos e as composições associadas podem ser utilizados para limitar ou eliminar a infestação de
25 coleópteros ou em qualquer hospedeiro de pragas, praga simbiote, ou ambiente no qual a praga está presente através de uma ou mais composições que compreendem a molécula de dsRNA aqui descrita na dieta das pragas.

A presente invenção proporciona ainda exemplos de composições de ácido nucleico que são homólogas a pelo menos uma porção das sequências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e

SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas. Um exemplo específico de tais ácidos nucleicos proporcionados pela invenção está descrito na SEQ ID NO 2 ou seu complemento.

5 Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para a supressão da expressão do gene de uma praga coleópteros, tais como bicudo-do-algodoeiro ou de espécies relacionadas, que compreende o passo de proporcionar na dieta da praga de uma quantidade gene supressor de pelo menos um dsRNA molécula transcrita a partir de uma sequência nucleotídica tal como aqui descrito, pelo menos, um segmento do qual é complementar a uma sequência miRNA dentro das células da praga. O método pode ainda compreender a morte, nanismo, ou cessação da alimentação da praga. Uma molécula de dsRNA, incluindo a sua
10 forma modificada tal como uma molécula de siRNA, alimentada a uma praga de acordo com o invento pode ser de pelo menos de cerca de 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou cerca de 100% de identidade com uma molécula de RNA transcrita a partir das seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas.

15 A presente invenção proporciona ainda uma molécula de dsRNA estabilizada ou a expressão de um ou mais miRNAs para a inibição da expressão de um gene alvo numa praga coleópteros expressa a partir desta sequência e os seus fragmentos. Um dsRNA estabilizada, incluindo uma molécula de siRNA ou miRNA ou pode compreender pelo menos duas sequências de codificação que são dispostos em um sentido e uma orientação anti-sentido em
20 relação a pelo menos um promotor, em que a sequência de nucleótideos que compreende uma cadeia com sentido e uma cadeia anti-sentido está relacionada ou ligada por uma sequência espaçadora de, pelo menos, a partir de cerca de cinco a cerca de mil nucleótideos, em que a cadeia com sentido e a cadeia anti-sentido podem ser formadas de comprimentos diferentes, e cada uma das duas partes codificam sequências de pelo menos 80% de identidade de
25 sequência, pelo menos, 90 %, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou 100% de identidade de sequência, a qualquer sequência de um ou mais nucleótido (s) de acordo com as seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas.

Além disso, a invenção fornece ainda um fragmento ou concatâmero de uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir das seqüências SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou
30 fragmentos ou complementos destas. O fragmento pode ser definido como causando morte, ou

prejudicando o desenvolvimento de um organismo nocivo quando expresso como um dsRNA e fornecido para a praga. O fragmento pode, por exemplo, compreender pelo menos cerca de 19, 21, 23, 25, 40, 60, 80, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 ou mais nucleotídeos contíguos das seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou 5 fragmentos ou complementos destas, ou um seu complemento. Um segmento de RNA benéfico para uso no presente invento é pelo menos de cerca de 19 a cerca de 30, ou cerca de 23 até cerca de 100 nucleotídeos até cerca de 2000 nucleótidos de comprimento ou mais. Particularmente útil para a presente invenção são seqüências de RNA, incluindo cerca de 19 a cerca de 600 nucleotídeos homólogas a uma seqüência alvo de pragas. A invenção proporciona 10 também um ácido ribonucleico expresso a partir de qualquer de tais seqüências, incluindo um dsRNA. A seqüência selecionada para utilização na expressão de um agente de supressão de gene pode ser construída a partir de uma única seqüência derivada de uma ou mais pragas alvo e destinada a ser utilizada na expressão de um RNA que funciona na supressão de um único gene ou família de genes em uma ou mais pragas alvo, ou a seqüência de DNA pode ser 15 construída como uma quimera de uma pluralidade de seqüências de DNA. Especificamente para a presente invenção essa família de genes está relacionada à família do gene da lacase.

Em ainda outro aspecto, o invento proporciona construções de DNA recombinante que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma molécula de dsRNA aqui descrita. O dsRNA pode ser formado por uma fita de transcrição da molécula de uma 20 seqüência de nucleotídeos que é pelo menos de cerca de 80% a cerca de 100% idêntica às seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas. Tais construções de DNA recombinante podem ser definidas como a produção de moléculas de dsRNA, capazes de inibir ou reduzir a expressão do gene alvo endógeno (s) numa célula praga após a ingestão. A construção pode incluir uma seqüência nucleotídica do 25 invento operativamente ligado a uma seqüência de promotor que funciona na célula hospedeira. A presente invenção pode se utilizar de promotores tecido-específicos ou constitutivos. Preferencialmente para a presente invenção os promotores tecido-específicos podem ser, mas não estão limitados a, promotores específicos para botões florais de plantas de algodão.

Construções de ácido nucleico de acordo com a invenção podem compreender pelo menos uma sequência de nucleótidos que não ocorre naturalmente e que pode ser transcrita em um RNA de cadeia simples, capazes de formar uma molécula de dsRNA in vivo por meio de hibridização. Tais sequências de dsRNA podem ser fornecidas na dieta de uma praga de coleópteros para alcançar a inibição desejada. Preferencialmente para a presente invenção a molécula de dsRNA é formada por seqüências de nucleotídeos substancialmente similares às seqüências selecionadas entre SEQ ID Nº 1 e SEQ ID Nº 2, ou fragmentos ou complementos destas.

Uma construção de DNA recombinante pode conter seqüências substancialmente similares às seqüências selecionadas entre SEQ ID Nº 1 e SEQ ID Nº 2, ou fragmentos ou complementos destas. Os dsRNAs podem expressar a partir de construções introduzidas em vários eventos de transformação diferentes, ou podem ser introduzidos numa única molécula de ácido nucleico. Os dsRNAs podem ser expressos utilizando um único promotor ou promotores múltiplos. Em um aspecto, a invenção proporciona uma célula hospedeira recombinante ter no seu genoma pelo menos uma sequência de DNA recombinante que é transcrito para produzir pelo menos uma molécula de dsRNA, que funciona quando ingeridos por uma praga coleópteros para inibir ou reduzir a expressão de um gene alvo em uma praga. A molécula de dsRNA pode ser codificada pelas seqüências selecionadas entre SEQ ID Nº 1 e SEQ ID Nº 2, ou fragmentos ou complementos destas. A presente invenção também proporciona uma célula vegetal transformada tendo no seu genoma pelo menos uma sequência de DNA recombinante aqui descrita. As plantas transgênicas que compreendem um tal célula de planta transformada são também fornecidas, incluindo as plantas de progênie de qualquer geração, as sementes, e produtos vegetais, cada uma compreendendo o DNA recombinante.

Os métodos e composições da presente invenção podem ser aplicadas a qualquer planta monocotiledônea e dicotiledônea, dependendo do controle de pragas coleópteros desejado. Assim, a presente invenção descreve uma planta transformada com uma sequência de DNA recombinante, como descrito as seqüências selecionadas entre SEQ ID Nº 1 e SEQ ID Nº 2, ou fragmentos, ou concatâmeros ou complementos destas, que é transcrito para produzir pelo menos uma molécula de dsRNA, que funciona quando ingerido por uma praga de coleópteros para inibir ou reduzir a expressão de um gene alvo.

A invenção proporciona também combinações de métodos e composições para controlar infestações de pragas de coleópteros. Um meio de fornecer um método dsRNA como aqui descrito para a protecção de plantas contra a infestação de insetos é em conjunto com um ou mais agentes insecticidas que exibem características diferentes das exibidas pelos métodos e composições de dsRNA. Por exemplo, uma ou mais proteínas de Bt pode ser fornecida na dieta das pragas de insetos, em combinação com um ou mais dsRNAs tal como aqui descrito. A composição formulada para aplicação tópica ou derivada utilizando uma abordagem transgênica, que combina os métodos e as composições de dsRNA com Bt pode ser utilizada para criar sinergias que não eram conhecidos anteriormente na arte para controlar a infestação de insetos. Uma sinergia é a redução no nível de expressão necessária para o dsRNA (s) ou a proteína de Bt (s). Quando combinadas, a menor dose eficaz de cada um dos agentes de controle de pragas pode ser usada. Acredita-se que as proteínas de Bt insecticidas crie poros de entrada através dos quais as moléculas de dsRNA são capazes de penetrar de forma mais eficaz em espaços remotos a partir do intestino da praga de insetos, ou de forma mais eficiente para as células na proximidade das lesões criadas pela proteína Bt, requerendo assim menos quantidade de Bt ou dsRNA para atingir o resultado desejado de ação insecticida ou a inibição desejada ou supressão de uma função biológica específica na praga alvo.

A presente invenção proporciona portanto uma composição que contenha dois ou mais diferentes agentes pesticidas tóxicos para a mesma praga ou espécie de insetos onde, pelo menos, um dos quais compreende um dsRNA aqui descritos. Em certas concretizações, o segundo agente pode ser um agente selecionado a partir do grupo que consiste de uma patatina, uma proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, uma proteína *Xenorhabdus* insecticida, uma proteína *Photorhabdus* insecticida, uma proteína de *Bacillus laterosporous* insecticida, uma proteína de *Bacillus sphaericus* insecticida, e uma lignina. Uma proteína de *Bacillus thuringiensis* insecticida pode ser qualquer uma de uma série de proteínas insecticidas, incluindo, mas não limitado a Cry 10, Cry8, Cry1, Cry35 TIC851, CryET70, Cry225 TIC901, TIC1201, TIC407, TIC417, proteína insecticida CryET33 e binário CryET34, proteína binária insecticida CryET80 e CryET76, proteína insecticida binária TIC100 e TIC101, binário insecticida da proteína PS 149B1, proteína VIP insecticida, proteína TIC900 ou afins, ou

combinações das proteínas insecticidas ET29 ou ET37 com proteínas insecticidas TIC810 ou TIC812 e quimeras inseticidas de qualquer uma das proteínas anteriores

Um ácido ribonucleico, que é fornecido na dieta, pode ser fornecido em uma dieta artificial formulada para satisfazer as necessidades nutricionais especiais para determinada praga. A dieta também pode ser uma célula recombinante transformada com uma sequência de DNA construída para a expressão do agente alvo, o RNA ou o agente de supressão de gene. Após a ingestão de uma ou mais células transformadas pela praga, o resultado desejado é fenotipicamente observado, indicando que o agente foi utilizado para inibir ou reduzir a expressão de uma sequência nucleotídica alvo que está dentro das células da praga.

Um gene alvo pode codificar para a supressão de uma proteína essencial. Para a presente invenção o gene alvo é da família da lacase cuja função é a formação do exoesqueleto. Portanto, a inibição ou redução da expressão de tal gene poderá afetar funções essenciais para sobrevivência do inseto a ser selecionada do grupo de apoptose celular, diferenciação e desenvolvimento celular, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, divisão celular, metabolismo energético, respiração, e formação e endurecimento da cutícula.

Um outro aspecto da presente invenção é fornecer um método para melhorar o rendimento de uma planta submetida a infestação de pragas de insetos, compreendendo o referido método os passos de: a) introdução de um polinucleotídeo compreendendo uma sequência substancialmente similar às seqüências selecionadas entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas ou concatâmeros na referida planta, e b) cultivar a planta de modo a permitir a expressão da referida característica.

Ainda outro aspecto da invenção proporciona produtos agrônômica e comercialmente importantes e/ou composições de matéria, incluindo, mas não limitado a, alimentos para animais, produtos de base, produtos e sub-produtos que se destinam a serem utilizados como alimentos para consumo humano ou para utilização nas composições e produtos que se destinam ao consumo humano, incluindo mas não se limitando a farinha de algodão, óleo de algodão, bolos de algodão, pluma de algodão, fibra de algodão, cereais, e assim por diante. Tais composições podem ser definidas como contendo uma quantidade detectável de uma sequência de nucleotídeos aqui estabelecidos, e, assim, também são diagnóstico para qualquer

acontecimento transgênico contendo tais sequências de nucleotídeos. Estes produtos são úteis, pelo menos, porque eles são susceptíveis de ser obtidos a partir de culturas propagadas com menos pesticidas organofosforados e como um resultado da sua incorporação dos nucleotídeos da presente invenção para controlar a infestação de pragas de coleópteros em plantas. Tais mercadorias e produtos de base podem ser produzidos a partir de sementes produzidas a partir de uma planta transgênica, em que a planta expresse RNA a partir de um ou mais nucleotídeos contíguos da presente invenção ou nucleotídeos de uma ou mais pragas de coleópteros e respectivos complementos.

Um método de produção de um produto deste tipo compreende a obtenção de uma planta transformada com um polinucleotídeo compreendendo uma sequência selecionada entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas ou concatâmero das mesmas, e preparação de um produto de base a partir da planta ou parte da mesma também é fornecido na presente invenção. Além disso, um método de produção de alimentação humana ou animal, que compreende a obtenção de uma planta transformada com um polinucleotídeo compreendendo uma sequência descrita em SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N°2, ou um fragmento ou concatâmero ou complemento da mesma, e preparar o alimento ou alimento para animais a partir da referida planta ou parte deste é ainda um outro aspecto da invenção.

A invenção também fornece um meio legível por computador tendo nele registado uma sequência selecionada entre SEQ ID N° 1 e SEQ ID N° 2, ou fragmentos ou complementos destas ou concatâmero das mesmas, para utilização num certo número de aplicações de computador, incluindo, mas não se limitando a identidade de DNA e busca de similaridade, identidade e pesquisa de similaridade de proteína, caracterizações de perfis de transcrição, comparações entre genomas, e análises de hibridação artificiais.

No contexto dessa descrição, inúmeros termos serão utilizados e por isso serão melhor detalhados a seguir.

O termo “ácido nucléico” refere-se a uma grande molécula a qual pode ser fita simples ou fita dupla, composta de monômeros (nucleotídeos) contendo um açúcar, um fosfato e uma base purina ou pirimidina. Um “fragmento de ácido nucléico” é uma fração de uma dada molécula de ácido nucléico. “Complementaridade” refere-se ao pareamento específico de bases purinas e pirimidinas que consistem de ácidos nucléicos: pares de adenina com timina e

pares de guanina com citosina. Então, o “complemento” de um primeiro fragmento de ácido nucléico refere-se ao segundo fragmento de ácido nucléico cuja seqüência de nucleotídeos é complementar à primeira seqüência de nucleotídeos.

5 Em plantas mais desenvolvidas, ácido desoxirribonucléico (DNA) é o material genético enquanto ácido ribonucléico (RNA) está envolvido na transferência da informação do DNA em proteínas. Um “genoma” é toda parte principal do material genético contida em cada célula de um organismo. O termo “seqüência de nucleotídeo” refere-se às seqüências de polímeros de nucleotídeos, formando uma fita de DNA ou RNA, as quais podem ser simples ou dupla-fita, opcionalmente sintéticas, não naturais ou com bases de nucleotídeos alteradas capazes de
10 incorporação dentro de polímeros de DNA ou RNA. O termo “oligômero” refere-se a seqüências curtas de nucleotídeos, usualmente até 100 bases de comprimento. O termo “homólogo” à ligação entre as seqüências de nucleotídeos de duas moléculas de ácido nucléico ou entre as seqüências de aminoácidos de duas moléculas de proteínas. A estimativa de tal homologia é provida através da hibridização de DNA-DNA ou RNA-RNA sob condições de
15 estringência como definido no estado da técnica (como mencionado no documento US20030074685, Hames and Higgins, Ed. (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, U.K); ou pela comparação de similaridade de seqüência entre duas moléculas de ácido nucléico ou proteína (como mencionado no documento US20030074685, Needleman et al., *J. Mol. Biol.* (1970) 48:443-453).

20 “Gene” refere-se ao fragmento de nucleotídeo que expressa uma proteína específica, incluindo seqüências regulatórias precedentes (região 5’ não traduzida) e posteriores (região 3’ não traduzida) à região codificadora. “Gene nativo” refere-se a um gene isolado com sua própria seqüência reguladora encontrada na natureza. “Gene quimérico” refere-se ao gene que compreende seqüências codificadoras, regulatórias e heterogêneas não encontradas na
25 natureza. O gene quimérico da presente invenção compreende moléculas isoladas de ácido nucleicos, na orientação sense ou antisense, ligadas operacionalmente a promotores ativos. Construções gênicas da presente invenção podem conter 1 ou mais genes quiméricos e podem ou não apresentar íntrons. “Gene endógeno” refere-se ao gene nativo normalmente encontrado em sua localização natural no genoma e não é isolado. Um “gene exógeno” refere-se a um
30 gene que não é normalmente encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido por

transferência gênica. “Pseudogene” refere-se a uma seqüência nucleotídica que não codifica uma enzima funcional.

“Seqüência codificadora” refere-se à seqüência de DNA que codifica uma proteína específica e exclui a seqüência não codificadora. Uma “seqüência codificadora interrompida”
5 significa a seqüência que atua como separadora (por exemplo, um ou mais íntrons ligados através de junções). Um “intron” é uma seqüência de nucleotídeo que é transcrita e está presente no pré mRNA, mas é removida através de clivagem e a re-ligação do mRNA dentro da célula gerando um mRNA maduro que pode ser traduzido em uma proteína. Exemplos de íntrons incluem, mas não são limitados a, intron pdk2, intron catalase da mamona, intron Delta
10 12 desnaturase de algodão, Delta 12 desnaturase de Arabidopsis, intron ubiquitina de milho, intron de SV40, íntrons do gene da malato sintase.

“Transcrito de RNA” refere-se ao produto resultante da transcrição catalisada pela RNA polimerase de uma seqüência de DNA. Quando o transcrito de RNA é uma cópia perfeita da seqüência de DNA, ele é referido com transcrito primário ou ele pode ser uma seqüência de
15 RNA derivada de um processo pós-transcricional do transcrito primário e é então referido como transcrito maduro. “RNA mensageiro (mRNA)” refere-se ao RNA que está sem íntrons. “RNA sense” refere-se a um transcrito de RNA que inclui o mRNA. “RNA antisense” refere-se a um transcrito de RNA que é complementar a todas as partes de um transcrito primário ou mRNA e que pode bloquear a expressão de um gene alvo através da interferência no
20 processamento, transporte e/ou tradução do seu transcrito primário ou mRNA. A complementaridade de um RNA antisense pode ser com qualquer parte do transcrito gênico específico, isto é, seqüência 5’ não traduzida, seqüência 3’ não traduzida, íntrons ou seqüência codificadora. Além disso, o RNA antisense pode conter regiões de seqüências ribozima que aumentam a eficácia do RNA antisense para bloquear a expressão gênica. “Ribozima” refere-se ao RNA catalítico e inclui seqüências específicas de endoribonucleases. “DsRNA (dupla-
25 fita)” refere-se a estrutura em grampo formada entre a seqüência do mRNA ou RNA sense, a seqüência de uma região espaçadora e a seqüência do RNA antisense. “Região espaçadora” refere-se à seqüência de nucleotídeo que não está relacionada com a seqüência do gene alvo, como a seqüência de um intron.

O termo “vetor” diz respeito a um replicon, como plasmídeo, fago ou vírus, no qual outras seqüências genéticas ou elementos (sejam eles de DNA ou RNA) podem ser ligados. Desta forma, os genes podem ser replicados juntamente com o vetor. O termo “vetor recombinante” é resultante da combinação de um vetor comercial com moléculas de ácido nucleico da presente invenção operacionalmente ligadas a um promotor de interesse e um sinal de terminação. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo aqueles fornecidos por Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.). Alguns exemplos de vetores utilizados na presente invenção, mas não limitados, são os vetores da série pCambia (BioForge Co.), pBI121(Chen, Po-Yen; Wang, Chen-Kuen; Soong, Shaw-Ching; To, Kin-Ying. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding vol. 11 issue 4 May 2003. p. 287-293), pBSK (Addgene Co.), pGEM-T easy (Promega Corporation), pET101/ D-TOPO (Invitrogen), A obtenção de vetores recombinantes compreendendo promotores ligados a ácidos nucleicos é conhecida no estado da técnica e pode ser encontrada em Sambrook et al. (Sambrook, J., Russell, D. W., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989).

“Substancialmente similar” ou “similaridade substancial” refere-se a fragmentos de ácidos nucléicos nos quais mudanças em uma ou mais bases de nucleotídeos não afetam a habilidade do fragmento de ácido nucléico mediar a alteração da expressão gênica pelo silenciamento gênico através, por exemplo, da tecnologia antisense, co-supressão ou RNA de interferência (RNAi). Fragmentos de ácido nucléico substancialmente similares da presente invenção podem ser caracterizados também pela porcentagem de similaridade de suas seqüências de nucleotídeos com as seqüências de nucleotídeo dos fragmentos de ácidos nucléicos descritas aqui (SEQ ID NO 1 e SEQ ID NO 2), como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucléicos preferidos são aqueles cujas seqüências de nucleotídeos têm pelo menos cerca de 40 ou 45% de identidade de seqüência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de seqüência, mais preferencialmente cerca de 80% ou

85% de identidade de seqüência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência quando comparada com a seqüência de referência. O alinhamento de seqüência e o cálculo de porcentagem de similaridade da presente invenção foram realizados utilizando-se o Programa DNAMAN for windows (Lynnon Corporation, 2001), utilizando seqüências depositadas no Gene Bank, através da integração do Web browser.

Uma das formas de se formar o dsRNA é estando presente na molécula de DNA a seqüência de nucleotídeos do gene alvo na orientação sense, e uma seqüência de nucleotídeos na orientação antisense, podendo haver ou não uma região espaçadora entre as seqüências de nucleotídeos sense e antisense. As seqüências de nucleotídeos mencionadas podem ser constituídas de cerca de 19nt a 2000nt ou ainda cerca de 5000 nucleotídeos ou mais, cada um tendo uma similaridade substancial de seqüência total com cerca de 40% a 100%. Quanto mais longa for a seqüência, menos estringência é requerida para similaridade substancial total da seqüência. Os fragmentos contendo pelo menos cerca de 19 nucleotídeos devem ter preferencialmente cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência quando comparada com a seqüência de referência, com possibilidade de ter cerca de 2 nucleotídeos distintos não contíguos.. Preferencialmente são utilizados fragmentos acima de 60pb, mais preferencialmente ainda fragmentos entre 100 a 500pb.

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

Convenientemente, o dsRNA (RNA de dupla fita) como descrito pode ser introduzido dentro de células hospedeiras pela introdução e possível integração de uma construção gênica contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção, transcrição das mesmas para produção do dsRNA. Portanto, em uma outra concretização, a invenção é também suportada por possuir uma construção gênica que é capaz de ser expressa em células de organismos

eucariotos de interesse, operacionalmente ligada a uma molécula de DNA que quando transcrita produz uma molécula de dsRNA compreendendo uma primeira região e uma segunda região, em que:

(a) a primeira região compreende uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos tendo uma similaridade substancial de seqüência com pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos da seqüência de nucleotídeos sense do gene alvo;

(b) a segunda região compreende uma seqüência de nucleotídeos de cerca de pelo menos 19 nucleotídeos consecutivos tendo uma similaridade substancial de seqüência com o complemento de cerca de pelo menos 19 nucleotídeos consecutivos da seqüência de nucleotídeos sense do gene alvo;

(c) a primeira e a segunda região são capazes de formar uma região de RNA dupla-fita, a qual pode ter, além do comprimento total da primeira e da segunda região, uma região espaçadora entre elas contendo pelo menos cerca de 19 nucleotídeos.

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

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

O promotor pode conter elementos “enhancers”. Um “enhancer” é uma seqüência de DNA que pode estimular a atividade do promotor. Ela pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível e/ou a tecido-especificidade de um promotor. “Promotores constitutivos” referem-se àqueles que dirigem a

expressão gênica em todos os tecidos e durante todo tempo. Promotores “tecido-específicos” ou “desenvolvimento-específicos” são aqueles que dirigem a expressão gênica quase que exclusivamente em tecidos específicos, tais como folhas, raízes, caules, flores, frutos ou sementes, ou em estágios do desenvolvimento específicos em um tecido, como no início ou final da embriogênese. O termo “expressão” refere-se a transcrição e acumulação estável do dsRNA derivado dos fragmentos de ácidos nucleicos da invenção que, em conjunto com a aparelhagem de produção de proteína da célula, resulta em níveis alterados de mio-inositol 1-fosfato sintase. “Inibição por interferência” refere-se a produção de transcritos de dsRNA capazes de prevenir a expressão da proteína alvo.

“Seqüências regulatórias apropriadas” referem-se a seqüências de nucleotídeos em genes nativos ou quiméricos que estão localizadas acima (região 5’ não traduzida), dentro, e/ou abaixo (região 3’ não traduzida) dos fragmentos de ácido nucleicos da invenção, as quais controlam a expressão dos fragmentos de ácido nucleicos da invenção.

“Níveis alterados” referem-se à produção de produtos gênicos em organismos transgênicos em quantidades ou proporções que diferem daquelas em organismos normais ou não-transgênicos. A presente invenção também relata vetores, os quais incluem seqüências do gene da enzima lacase na orientação sense e antisense, e células hospedeiras, as quais são geneticamente engenheiradas com vetores da invenção. “Transformação” refere-se a transferência do gene exógeno para dentro do genoma de um organismo hospedeiro e sua herança geneticamente estável.

“Plantas” referem-se a organismos fotossintéticos, ambos eucariotos e procariotos, onde o termo “plantas desenvolvidas” refere-se a plantas eucariotas. Os ácidos nucleicos da invenção podem ser utilizados para conferir tratos desejados em essencialmente qualquer planta. Então, a invenção possui uso sobre várias espécies de plantas, incluindo espécies dos gêneros Anacardium, Anona, Arachis, Artocarpus, Asparagus, Atropa, Avena, Brassica, Carica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Carthamus, Cocos, Coffea, Cucumis, Cucurbita, Daucus, Elaeis, Fragaria, Glycine, Gossypium, Helianthus, Heterocallis, Hordeum, Hyoseyamus, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Malus, Manihot, Majorana, Medicago, Nicotiana, Olea, Oryza, Panicum, Pannesetum, Passiflora, Persea, Phaseolus, Pistachia, Pisum,

Pyrus, Prunus, Psidium, Raphanus, Ricinus, Secale, Senecio, Sinapis, Solanum, Sorghum, Theobromus, Trigonella, Triticum, Vicia, Vitis, Vigna, e Zea.

Em um dos aspectos da invenção, o promotor é um promotor expresso em plantas. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em plantas” significa uma seqüência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de planta. Isso inclui qualquer promotor de origem vegetal; qualquer promotor de origem não vegetal o qual seja capaz de direcionar a expressão em uma célula vegetal, por exemplo promotores de origem viral ou bacteriana tais como CaMV35S (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hapster et al, 1988 Mol. Gen. Genet. 212, 182-190) e promotores do gene presentes no T-DNA de Agrobacterium; promotores tecido-específicos ou órgão-específicos, incluindo mas não limitados a promotores semente-específicos (WO8903887), promotores específicos de órgãos primordiais (como mencionado no pedido de patente US20030175783, An et al., 1996 The Plant Cell 8, 15-30), promotores específicos de caule (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1988 EMBO J. 7: 3625-3633), promotores específicos de folhas (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hudspeth et al., 1989 Plant Mol Biol 12:579-589), promotores específicos de mesófilo, promotores específicos de raiz (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1989 Genes Devel. 3:1639-1646), promotores específicos de tubérculos (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keil et al., 1989 EMBO J. 8: 1323:1330), promotores específicos de tecidos vasculares (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Peleman et al., 1989 Gene 84: 359-369), promotores específicos de estames (WO8910396, WO9213956), promotores específicos da zona de deiscência (WO9713865); e semelhantes.

O sinal de terminação da transcrição e a região de poliadenilação da presente invenção inclui, mas não está limitado a, sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de Agrobacterium tumefaciens (nos), sinal de terminação do gene RNA 35S do CaMV, sinal de terminação do vírus que ataca o Trifolium subterranean (SCSV), sinal de terminação do gene trpC de Aspergillus nidulans, e outros semelhantes.

A presente invenção também inclui prover moléculas de dsRNA, as quais podem ser obtidas por transcrição das moléculas contidas nas construções gênicas, e que são úteis para os métodos de acordo com a invenção.

5 Um outro objeto da presente invenção é prover células eucariotas, e organismos eucariotas contendo moléculas de dsRNA da invenção, ou contendo os gene quiméricos ou as construções gênicas capazes de produzir moléculas de dsRNA da invenção. As construções gênicas podem estar estavelmente integradas no genoma das células de organismos eucariotas.

10 Em outro aspecto da invenção, as construções gênicas podem estar providas em uma molécula de DNA capaz de se replicar de forma autônoma nas células de organismos eucariotas, tais como vetores virais. A construção gênica ou o dsRNA pode também estar disposto de forma transiente nas células de organismos eucariotas.

15 As construções gênicas ou gene quimérico da invenção podem ser introduzidas dentro do genoma da planta hospedeira desejada através de uma variedade de técnicas convencionais. Por exemplo, pode ser introduzido diretamente dentro do DNA genômico da célula vegetal utilizando técnicas tais como eletroporação e microinjeção de protoplastos de células de plantas, ou a construção pode ser introduzida diretamente no tecido vegetal utilizando-se métodos balísticos, tais como bombardeamento de partículas recobertas com DNA.

20 Técnicas de microinjeção são conhecidas no estado da técnica e bem descritas em literatura científica e patentária. A introdução de construções gênicas utilizando-se precipitações de polietileno glicol é descrita em Paszkowski et al. *Embo J.* 3:2717-2722, 1984 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de eletroporação são descritas em From et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824, 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de transformações balísticas são descritas em Klein et al. *Nature* 327:70-73, 1987 (como mencionado no pedido de patente
25 US20020152501).

30 Alternativamente, as construções gênicas podem ser combinadas com regiões flanqueadoras de T-DNA apropriadas e introduzidas dentro de vetor convencional hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens*. A função de virulência do hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens* direcionará a inserção das construções gênicas e marcador adjacente dentro do DNA da célula vegetal quando a célula é infectada pela bactéria. Técnicas de transformação

mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluindo desarmamento e o uso de vetores binários, são bem descritas na literatura científica (como mencionado no pedido de patente US 20020152501, Horsch et al. *Science* 233:496-498, 1984; e Fraley et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803, 1983).

5 Células de plantas transformadas que são derivadas de qualquer uma das técnicas de transformação descritas acima podem ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado e então o fenótipo desejado tal como expressão de uma molécula que cause ausência ou redução da formação do exoesqueleto de insetos coleópteros. Tais técnicas de regeneração contam com a manipulação de certos fitohormônios em meio de
10 crescimento de cultura de tecidos, tipicamente contendo um marcador biocida e/ou herbicida, que deve ser introduzido junto com a seqüência de nucleotídeos desejada. Regeneração de plantas a partir de cultura de protoplastos é descrita em Evans et al., *Protoplasts Isolation and Culture*, *Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; e Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press,
15 Boca Raton, 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). A regeneração pode ser também obtida através de calos de planta, explantes, órgãos, ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são descritas geralmente em Klee et al., *Ann. Ver. Of Plant Phys.* 38:467-486, 1987 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

Sem restringir a invenção para um particular modo de ação, espera-se que a enzima em
20 células eucariotas responsável por gerar pequenas moléculas de RNA com cerca de 21 nucleotídeos de dsRNA (como a DICER em *Drosophila*) possa ser saturada através da inclusão de um excesso de seqüências de dsRNA (isto é, moléculas de RNA complementares) que não estão relacionadas com a seqüência de nucleotídeos do gene alvo ou do gene a ser silenciado.

A variação natural na regulação posterior da expressão do gene alvo ocorrendo entre
25 diferentes linhagens de organismos eucariotos compreendendo a mesma molécula de dsRNA será substituída através da manipulação do espectro de silenciamento gênico. Esse fato pode ocorrer através da inclusão de seqüências de nucleotídeos de dsRNA extras não relacionadas com o gene alvo, as quais são operacionalmente ligadas aos dsRNA formados pela primeira e segunda região.

As concretizações da presente invenção podem ser efetivas contra uma variedade de pragas. Para os propósitos da presente invenção, as pragas incluem, mas não estão limitadas a, insetos, fungos, bactérias, nematóides, ácaros, patógenos protozoários, parasitas animais, e semelhantes. Pragas de particular interesse são insetos-praga, particularmente insetos-praga que causam danos significativos para plantas agrícolas. Entende-se como “insetos-praga” insetos e outras pragas similares tais como, por exemplo, os insetos das ordens Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., particularmente Coleoptera, especialmente *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida. Insetos-praga da presente invenção da maioria das cultivares incluem, mas não estão limitadas a: Milho - *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea grandiosella*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Diatraea saccharalis*, *Diabrotica virgifera*, *Diabrotica longicornis barberi*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Melanotus spp.*, *Cyclocephala borealis*, *Cyclocephala immaculata*, *Popillia japonica*, *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*, *Rhopalosiphum maidis*, *Anuraphis maidiradicis*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus sanguinipes*, *Hylemya platura*, *Agromyza parvicornis*, *Anaphothrips obscurus*, *Solenopsis milesta*, *Tetranychus urticae*; Sorgo - *Chilo partellus*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Feltia subterranea*, *Phyllophaga crinita*, *Eleodes*, *Conoderus*, e *Aeolus spp.*, *Oulema melanopus*, *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*, *Rhopalosiphum maidis*, *Sipha flava*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Contarinia sorghicola*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Tetranychus urticae*; Trigo - *Pseudaletia unipunctata*, *Spodoptera frugiperda*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Agrotis orthogonia*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Oulema melanopus*, *Hypera punctata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Schizaphis graminum*, *Macrosiphum avenae*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Melanoplus sanguinipes*, *Mayetiola destructor*, *Sitodiplosis mosellana*, *Meromyza americana*, *Hylemya coarctata*, *Frankliniella fusca*, *Cephus cinctus*, *Aceria tulipae*; Girassol - *Cylindrocapturus adspersus*, *Smicronyx fulus*,

Smicronyx sordidus, *Suleima helianthana*, *Homoeosoma electellum*, *Zygogramma exclamationis*, *Bothyrus gibbosus*, *Neolasioptera murtfeldtiana*; Algodão - *Heliothis virescens*, lagarta-das-maçãs; *Helicoverpa zea*, lagarta da espiga do milho; *Spodoptera exigua*, lagarta do cartucho; *Pectinophora gossypiella*, lagarta rosada; *Anthonomus grandis*, bicudo-do-algodoeiro; *Aphis gossypii*, pulgão-do-algodoeiro; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltadora do algodão; *Trialeurodes abutilonea*, mosca branca Bemisia tabaci; *Melanoplus femurrubrum*, gafanhoto; *Melanoplus differentialis*, gafanhoto; *Thrips tabaci*, tripes-do-fumo; *Frankliniella fusca*, tripes; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro vermelho; *Tetranychus urticae*, ácaro-rajado; Arroz - *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Colaspis brunnea*, *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Sitophilus oryzae*, *Nephotettix nigropictus*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Acrosternum hilare*; Soja - *Pseudoplusia includens*, *Anticarsia gemmatalis*, *Plathypena scabra*, *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Epilachna varivestis*, *Myzus persicae*, *Empoasca fabae*, *Acrosternum hilare*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Hylemya platura*, *Sericothrips variabilis*, *Thrips tabaci*, *Tetranychus turkestanii*, *Tetranychus urticae*; Cevada - *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Schizaphis graminum*, *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*, *Euschistus servus*, *Jylemya platura*, *Mayetiola destructor*, *Petrobia latens*; Canola - *Vrevicoryne brassicae*, *Phyllotreta cruciferae*, *Phyllotreta striolata*, *Phyllotreta nemorum*, *Meligethes aeneus*, *Meligethes rufimanus*, *Meligethes nigrescens*, *Meligethes canadianus*, e *Meligethes viridescens*; Batata - *Leptinotarsa decemlineata*.

EXEMPLOS

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

Técnicas usuais de biologia molecular tais como transformação de bactérias e eletroforese em gel de agarose de ácidos nucleicos são referidos através de termos comuns para descrevê-los. Detalhes da prática dessas técnicas, bem conhecidos no estado da técnica, são descritos em Sambrook, et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989),

Cold Spring Harbor Laboratory Press). Várias soluções utilizadas nas manipulações experimentais são referidas por seus nomes comuns tais como “solução de lise”, “SSC”, “SDS”, etc. As composições dessas soluções podem ser encontradas na referência Sambrook, et al. (supracitada).

5 **Exemplo 1 – Síntese de dsRNA de Lacase 2 de *Anthonomus grandis***

Ovos, larvas e insetos adultos de *A. grandis* foram criados no Laboratório de Bioecologia e Semioquímicos de Insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF. A colônia foi alimentada com dieta artificial como descrito por Monnerat e colaboradores (MONNERAT, R. G. et al. Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. **Comunicado Técnico - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v. 46, p. 4, 2000. MONNERAT, R. G. et al. Parâmetros bionômicos do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) criado em dieta artificial para a realização de biensaaios. . **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 29, p. 20, 2002) e mantida a 26 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

15 Para a clonagem e sequenciamento de uma fragmento de lacase 2 de *A. grandis*, o RNA total foi extraído de ovos, larvas e insetos adultos utilizando Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 5µg de RNA total utilizando o kit Superscript II TM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) utilizando oligo d(T)-AP. Para a amplificação inicial do fragmento de Lacase 2 foram utilizados iniciadores desenhados a partir da sequencia obtida do banco de dados de transcritoma de *A. grandis*, correspondendo a uma região do sítio de ligação ao cobre da Lacase 2. As sequências dos iniciadores foram 5'GCTCCGCTTCTATCTCAGT3' e 5'GCAATGGTGTCTTTACCG3' para a o iniciador direto e reverso, respectivamente. Foi realizada uma reação de polimerase em cadeia (PCR) nas seguintes condições: 94°C por 1 min, 20 temperatura de anelamento 60°C e extensão a 72 °C por 1 minuto por 30 ciclos.

25 Para a síntese do RNA dupla fita o fragmento de 332 pb amplificado e sequenciado [SEQ ID Nº 2] foi utilizado como molde. O programa BLOCK-iT™ RNAi Designer (disponível em <http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>), foi utilizado para analisar a seqüência de 332pb e indicar regiões de maior probabilidade para uso em silenciamento gênico

Os RNAs dupla fita foram sintetizados a partir de produto da PCR de 332 pb flanqueados pela sequência mínima do promotor T7. O produto da PCR foi clonado e sequenciado para checagem da sequência.

Após a confirmação da sequência a síntese de dsRNA foi realizada utilizando 0,5µg de produto de PCR como molde para um volume de reação de transcrição de 20 µL, conforme descrito no protocolo do manual do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion).

A reação foi incubada por 16 hs a 37°C, seguido por tratamento com DNase I por 15 minutos. Para alinhamento do RNA fita dupla, os produtos da reação foram incubados a 70°C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente (22°C). Para purificação dos produtos da transcrição seguiu-se uma extração com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico, conforme protocolo descrito pelo fabricante do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion). O dsRNA foi dissolvido em água tratada com DEPC, e após quantificação por espectrofotometria, a quantidade determinada foi de 4 µg de dsRNA.

Exemplo 2 - Bioensaios de microinjeção de dsRNA e avaliação do silenciamento do gene que codifica Lacase 2 em *A. grandis*.

Foi identificada uma sequência de cDNA do gene da Lacase 2 no transcrito de *Anthonomus grandis*, cujo tamanho foi de 1817pb (SEQ ID Nº 1). Dentro desta sequência foi selecionada uma região de 332pb (SEQ ID Nº 2) para servir de molde para a síntese de moléculas de dsRNA, conforme descrito no exemplo 1.

Esse dsRNA foi utilizado em ensaios de microinjeção e os efeitos do silenciamento foram verificados por meio de análise morfológica, mortalidade e diminuição dos níveis de expressão do gene da lacase2 por PCR em tempo real.

Análise morfológica e mortalidade

O bioensaio com bicudo do algodoeiro foi feito por microinjeção de dsRNA. Larvas foram pesadas para que fossem utilizadas apenas indivíduos com peso entre 30 e 40mg. Em cada ensaio, 1µL contendo 500ng de dsRNA foram injetados em na região dorsal de larvas de 3º instar, tomando o cuidado de não lesar a artéria dorsal. Na microinjeção foi utilizada uma microseringa (Hamilton Co.), tipo Gastight com conexão Luer (LT), modelo 1701LT, volume 10µL, com agulha de 51mm, gauge 26S, estilo de ponta 4 e bisel de 12°. Vinte larvas de

bicudo foram microinjetados e mantidos em dieta artificial mantida a 26 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Uma avaliação morfológica foi realizada ao longo do tempo até 60 dias após a injeção. Este experimento foi repetido três vezes, em épocas diferentes. Neste experimento, insetos com 20 dias após a microinjeção conseguiram entrar na fase de pupa, mas o desenvolvimento foi anormal, gerando um híbrido de pupa/adulto (Figura 1b, c, d e Anexo 1), com cutícula mal formada, cheia de protuberâncias anormais (Figura 1a e Anexo 1), e coloração mais clara. No entanto, a maioria destes insetos deformados estava morta quando analisada e nenhum dos insetos chegou à fase adulta normalmente, com nenhum sobrevivente 25 dias após a microinjeção.

No mesmo experimento, observou-se que 20 dias após a microinjeção, alguns insetos continuavam na fase larval, vivos, e se alimentando. Porém, com 30 dias, todas estas larvas estavam mortas. O acúmulo de lipídeos que ocorre normalmente no último instar da fase larval foi observado mostrando que a larva continuou se alimentando após a microinjeção (Figura 2b e Anexo 2). Este acúmulo de lipídeos serve como depósito de energia para a fase de pupa que não se alimenta. Porém, como estas larvas não entraram na fase de pupa, sua aparência é de larvas “estufadas”, já que aparentemente não houve crescimento da cutícula que acompanhasse o aumento de volume corporal (Figura 2b, d e Anexo 2). Estruturas semelhantes ao ovipositor das fêmeas adultas ou edeago (órgão copulador) masculino aparecem nestas larvas (Figura 2e, f e Anexo 2).

A figura 3 mostra um esquema do ciclo de vida do bicudo com um resumo do que aconteceu temporalmente nos experimentos. No ciclo de aproximadamente 30 dias, a microinjeção foi feita por volta do 18º dia (Figura 3, seta azul). Observados no 20º dia após a microinjeção, cerca de 50 dias de ciclo (Figura 3, seta vermelha), os três experimentos de bioensaio, com 20 larvas cada um, geraram o resultado visto na figura 4. Cerca de 10% das larvas microinjetadas com H₂O (controle) e 25% das microinjetadas com dsRNA morreram provavelmente por manipulação. As larvas restantes do experimento-controle (90%) chegaram à fase adulta e a placa estava cheia de ovos e algumas larvas recentes, mostrando que a injeção de H₂O aparentemente não afetou a reprodução dos insetos. Das larvas microinjetadas com dsRNA de lacase 2, 33% ainda eram larvas e 42% chegaram a continuar o ciclo (Figura 4),

mas pararam em algum momento entre pupa e adulto, sendo que no momento da observação estavam mortas.

Análise dos níveis de expressão do gene lacase2 após microinjeção com dsRNA de lacase2

5 Bioensaios com microinjeção de dsRNA de lacase 2 foram realizados conforme descrito anteriormente para extração de RNA total e posterior análise por qRT-PCR. Larvas microinjetadas com dsRNA de lacase2 ou com H₂O foram coletadas 20 dias após a microinjeção. Pupas/Adultos mal formados foram coletados 14 dias após a microinjeção. A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit Superscript IIITM First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen), seguindo orientações do fabricante. Para síntese de cDNA, foi
10 extraído RNA total de larvas e de adultos triturados em almofariz contendo N₂ líquido, utilizando o reagente de Trizol (Invitrogen Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com 2U de DNase I RNase-free (Ambion, Invitrogen Life Sciences) por 30 minutos a 37 °C, de acordo com instruções do fabricante. Após etapa de
15 limpeza em coluna do kit RNeasy Micro Kit (QIAGEN) e verificação da qualidade da amostra em gel de agarose 1,5%, a síntese de cDNA foi feita utilizando o kit Superscript IIITM First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen), a partir de 500ng de RNA, seguindo orientações do fabricante.

Para realização da qRT-PCR foi utilizado o termociclador 7500 Fast (Applied
20 Biosystems, EUA) utilizando *primers* específicos para cada gene (Tabela 7). Cada reação foi feita num volume final de 10 µL, sendo 2,5 µL de SYBR Green Rox Plus PCR Mix (LGC Biotecnologia), 2 µL de cDNA diluído 40 vezes, 4,7 µL de H₂O bidestilada e 0,4 µL de cada *primer* (0,2 µM direto e reverso). A reação ocorreu a 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de incubações a 95 °C por 15s e a 60 °C por 1 min. Ao final dos 40 ciclos uma curva de
25 dissociação para cada fragmento amplificado (60-94°C, a cada 0,5 °C por 1 s) foi feita para verificar a possível formação de dímeros de *primer* ou contaminação da amostra. As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata e controles negativos contendo água ao invés de cDNA foram incluídos para verificar contaminações nas amostras. Um controle negativo contendo RNA total foi feito para garantir a ausência de DNA genômico. Os níveis de expressão foram

determinados como o número de ciclos necessários para alcançar um limite fixo na fase exponencial da PCR. O número de ciclos foi referido como valor de Cq (*quantification cycle*), em substituição ao nomes para os antigos Ct (*threshold cycle*) ou Cp (*crossing point*), de acordo com as normas RDML (LEFEVER et al., 2009). A eficiência de cada *primer* para cada reação e as Cqs foram calculados individualmente a partir do software qPCR miner (www.miner.ewindup.info) (ZHAO; FERNALD, 2005).

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios, foi realizada uma análise da expressão relativa do gene da lacase2A por qRT-PCR, nos dois tipos insetos encontrados 20 dias após a microinjeção. As pupas/adultos deformados tiveram que ser coletadas com menos tempo (14 dias após a microinjeção), uma vez que foi difícil encontrar indivíduos vivos com 20 dias. Nestas, a expressão do gene da lacase2A foi diminuída cerca de 15 vezes (Figura 5A) em relação à expressão do mesmo gene em pupas provenientes de larvas microinjetadas com H₂O. O gene da lacase2A foi cerca de 3 vezes menos expresso nas larvas microinjetadas com dsRNA e que continuaram larvas vivas após 20 dias (Figura 5B).

Estes resultados indicam um efeito sobre a formação e esclerotização da cutícula do inseto, uma vez que o gene de lacase2A é expresso nas células epiteliais subcuticulares, quando há formação de nova cutícula e esclerotização, como nos casos de muda.

Quanto ao fenótipo, larvas de 3º instar microinjetadas tiveram alteração no seu desenvolvimento. Houve variação desse fenótipo Uma parte das larvas não conseguiu continuar seu desenvolvimento, permanecendo como larvas por um tempo maior, o que levou à morte. Algumas larvas conseguiram entrar na fase de pupa. No entanto, estas não chegaram a fase adulta e apresentaram malformações no exoesqueleto (Figura 2).

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada por ser selecionado do grupo consistindo de:

5 a. Molécula de ácido nucléico isolada compreendendo uma sequência de ácido nucleico substancialmente similar às sequências selecionadas entre SEQ ID No 1 e SEQ ID No 2;

10 b. Molécula de ácido nucléico isolada que hibridiza com uma sequência de ácidos nucleicos indicada pelas sequências selecionadas entre SEQ ID No 1 e SEQ ID No 2, sob condições de lavagem de 5X SSC, formamida a 50% e 42°C; por 10min;

15 c. Fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de ácidos nucleicos selecionada selecionadas entre SEQ ID No 1 e SEQ ID No 2, onde a ingestão, por coleópteros-praga de plantas, da sequência de um ribonucleotídeo de filamento duplo, compreendendo pelo menos um filamento complementar do referido fragmento, inibe ou reduz a proliferação da referida praga; e

d. Complemento da sequência de (a), (b) ou (c).

20 2. Molécula de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser selecionada do grupo compreendendo as sequências SEQ ID No 1 e SEQ ID No 2.

3. Gene quimérico caracterizado por compreender:

a) um polinucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2; e

b) um promotor ativo, operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (a).

25 4. Construção gênica caracterizada por compreender um ou mais genes quiméricos de acordo com a reivindicação 3.

5. Construção gênica caracterizada por compreender:
- (a) uma primeira região compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos tendo uma similaridade substancial de seqüência com pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos da seqüência de nucleotídeos sense conforme descrita em SEQ ID No 1 ou SEQ ID No 2;
- 5 (b) uma segunda região compreendendo uma seqüência de nucleotídeos de cerca de pelo menos 19 nucleotídeos consecutivos tendo uma similaridade substancial de seqüência com o complemento de cerca de pelo menos 19 nucleotídeos consecutivos da seqüência de nucleotídeos sense conforme descrita em SEQ ID No 1 ou SEQ ID No 2.
- 10 6. Construção gênica de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato da primeira e a segunda região serem capazes de formar uma região de RNA dupla-fita, a qual pode ter, além do comprimento total da primeira e da segunda região, uma região espaçadora entre elas contendo pelo menos cerca de 19 nucleotídeos.
- 15 7. Construção gênica de acordo com a reivindicação 6 caracterizada pelo fato da seqüência espaçadora ser um íntron.
8. Vetor caracterizado por compreender a molécula de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 1.
9. Vetor de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de o referido vetor ser capaz de promover a expressão da molécula de interesse ou um fragmento desta.
- 20 10. Seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo caracterizada por ser produzida a partir da expressão de uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1.
- 25 11. Seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo de acordo com a reivindicação 10 caracterizada pelo fato da ingestão por coleópteros-praga de plantas, da seqüência de um ribonucleotídeo de filamento duplo, compreendendo pelo menos um filamento complementar do referido fragmento, inibe ou reduz a proliferação da referida praga.

12. Célula transformada caracterizada por compreender a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1.
13. Célula de acordo com a reivindicação 12 caracterizada por ser uma célula procariótica.
- 5 14. Célula de acordo com a reivindicação 12 caracterizada por ser uma célula eucariótica.
15. Célula de acordo com a reivindicação 12 caracterizada por ser uma célula de vegetal ou bactéria.
- 10 16. Planta transformada caracterizada por compreender a molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2.
- 15 17. Planta de acordo com a reivindicação 16 caracterizada pelo fato da molécula de ácido nucleico ser expressa em uma célula vegetal, sob a forma de uma sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo, e a ingestão de dieta contendo uma quantidade inibidora, para inseto-praga, da referida sequência do ribonucleotídeo de filamento duplo inibe ou reduz a proliferação da referida praga.
- 20 18. Planta de acordo com a reivindicação 17 caracterizada pelo fato do inseto-praga ser selecionado pelo grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera* e *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida.
- 25 19. Produto comerciável caracterizado pelo fato de ser produzido a partir de uma planta de acordo com a reivindicação 16 onde o referido produto comerciável compreende uma quantidade detectável da molécula de ácido nucleico conforme definida na reivindicação 1 ou de um ribonucleotídeo expresso a partir da mesma.

20. Método para produzir organismos eucarióticos transgênicos nos quais a expressão de um gene alvo nas células do organismo é reduzida, caracterizado por compreender os estágios de:
- I) prover uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1;
 - 5 II) inserir a molécula obtida em “I” em célula ou células do organismo para produzir uma célula ou células transgênicas; e
 - III) crescer ou regenerar um organismo eucarioto transgênico da célula ou células transgênicas.
21. Método para controle de infestação de coleópteras caracterizado por compreender o fornecimento, na dieta de um coleóptera-praga, de um agente compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação I ou uma seqüência de ribonucleotídeo de filamento duplo de acordo com a reivindicação 10.
- 10
22. Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado pelo fato da célula do organismo eucarioto compreender ainda uma seqüência de plonucleotídeo que codifica um agente pesticida.
- 15
23. Método de acordo com a reivindicação 22 caracterizado pelo fato do agente pesticida ser selecionado do grupo consistindo de patatina, uma proteína inseticida de *Bacillus thuringiensis*, uma proteína *Xenorhabdus* inseticida, uma proteína Photorhabdus inseticida, uma proteína de *Bacillus laterosporous* inseticida, uma proteína de *Bacillus sphaericus* inseticida, e uma lignina.
- 20
24. Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado pelo fato do coleóptero praga ser selecionado do grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida.
- 25

25. Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado pelo fato que o modo de atuação da molécula de ácido nucleico ou da sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo, ao ser ingerida pela praga, é o de supressão ou redução da expressão de um gene que execute uma função essencial para sobrevivência do inseto.
- 5 26. Método de acordo com a reivindicação 25 caracterizada pelo fato da função essencial para sobrevivência do inseto ser selecionada do grupo de apoptose celular, diferenciação e desenvolvimento celular, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, divisão celular, metabolismo energético, respiração e formação e endurecimento da cutícula.
- 10 27. Método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:
- a. Introdução de uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 na referida planta;
 - b. Cultivo da planta obtida em “a” de modo a permitir a expressão da referida molécula de ácido nucleico, onde essa expressão inibe ou reduz a proliferação da referida praga.
- 15
28. Método de acordo com a reivindicação 27 caracterizado pelo fato da expressão da molécula de ácido nucleico produzir uma molécula de RNA que suprime, pelo mesmo, um primeiro gene alvo em um inseto-praga que ingeriu uma porção da referida planta onde o gene alvo executa, pelo menos uma função essencial para sobrevivência do inseto ser selecionada do grupo de apoptose celular, diferenciação e desenvolvimento celular, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, divisão celular, metabolismo energético, respiração e formação e endurecimento da cutícula.
- 20
29. Método de acordo com a reivindicação 28 caracterizada pelo fato do inseto-praga ser selecionado do grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*,
- 25

Tenebrio molitor, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida.

- 5 30. Método de produção de um produto comerciável caracterizado pelo fato de compreender a obtenção de uma planta definida de acordo com a reivindicação 16, ou parte da mesma, e o preparo de um produto comerciável a partir da planta ou parte da mesma.
- 10 31. Método de produção de alimento ou ração caracterizado pelo fato de compreender a obtenção de uma planta definida de acordo com a reivindicação 16, ou parte da mesma, e o preparo de alimento ou ração a partir da referida planta ou parte da mesma.

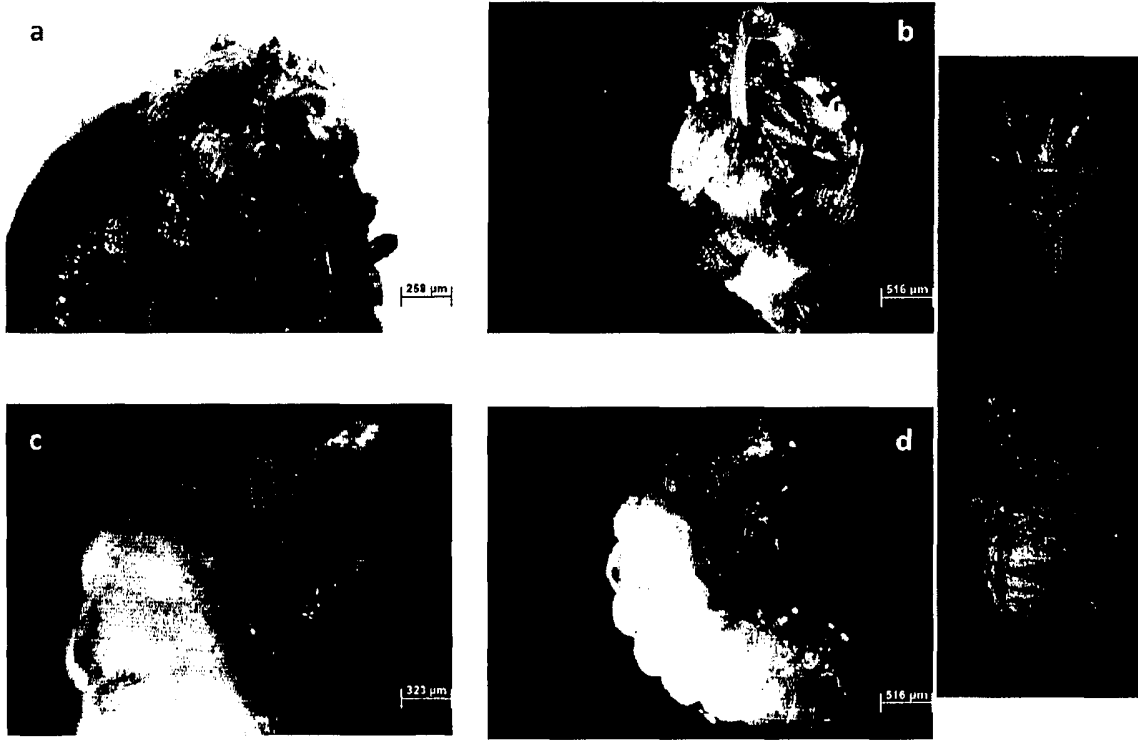


Fig. 1

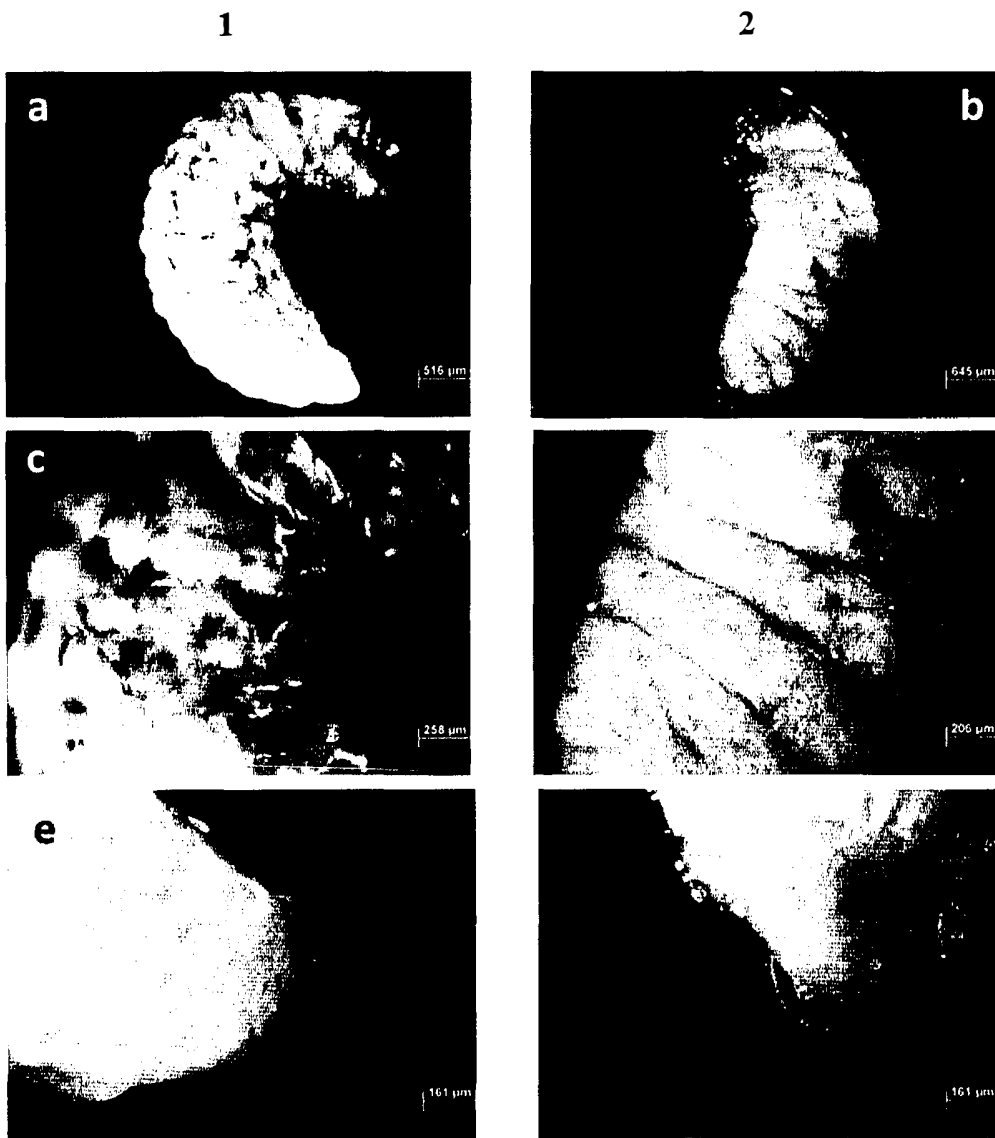


Fig. 2

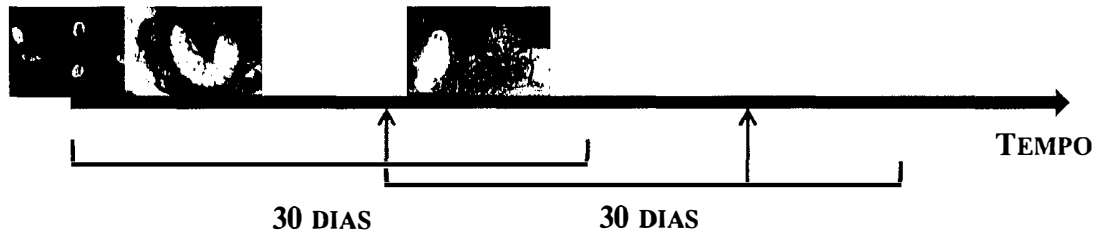


Fig. 3

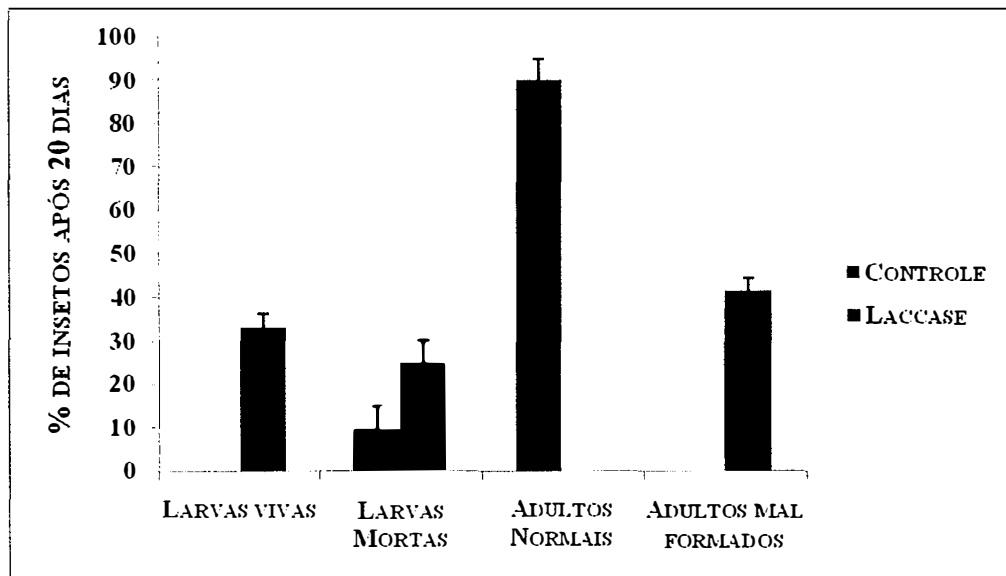


Fig. 4

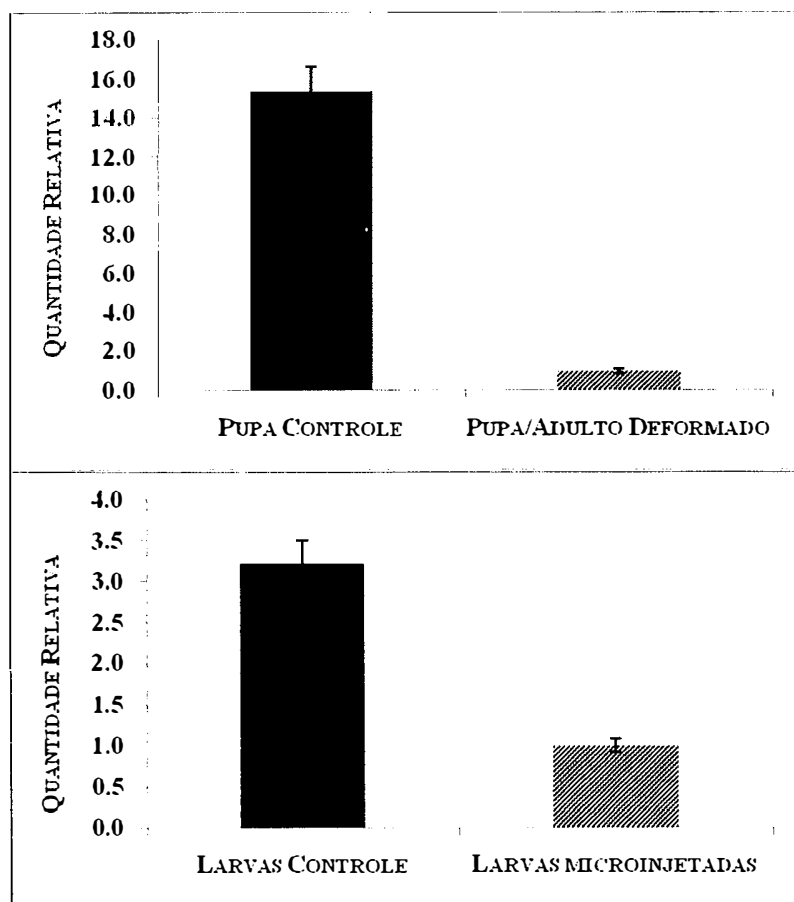


Fig. 5

RESUMO

“MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DA FAMÍLIA DA LACASE”.

5 A presente invenção está relacionada ao controle de infestação de praga através da
inibição ou redução da expressão de genes da família da lacase. A invenção provê ainda
métodos e composições para o controle de pragas, através da alimentação de uma ou mais
moléculas de RNA de fita dupla provida pela presente invenção. A invenção descreve ainda
um método de obtenção de plantas transgênicas que expressem moléculas de RNA de fita
10 dupla. A presente invenção é preferencialmente utilizada para plantas de algodoeiro.