



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013030724-2 B1



(22) Data do Depósito: 31/05/2012

(45) Data de Concessão: 27/10/2020

(54) Título: GENE QUIMÉRICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, USO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO E MÉTODO PARA PRODUIR UMA PLANTA TRANSGÊNICA POSSUINDO RESISTÊNCIA AUMENTADA À PRAGA DE INSETO

(51) Int.Cl.: C12N 9/88; C12N 15/60; C12N 15/82; A01H 5/00; C12Q 1/68.

(30) Prioridade Unionista: 06/03/2012 US 61/607008; 31/05/2011 US 61/491339.

(73) Titular(es): KEYGENE N.V..

(72) Inventor(es): ROBERT CORNELIS SCHUURINK; MICHAEL ALBERTUS HARING; PETRONELLA MARTINA BLEEKER.

(86) Pedido PCT: PCT NL2012050382 de 31/05/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/165961 de 06/12/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/11/2013

(57) Resumo: ?PROTEÍNA ISOLADA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, SINTÉTICA OU RECOMBINANTE, GENE QUIMÉRICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODOS PARA PREPARAR COMPOSTO DE 7-EPIZINGIBERENO E/OU R-CURCUMENO, PARA PRODUIR UMA PLANTA TRANSGÊNICA, E PARA IDENTIFICAR UM POLIMORFISMO GENÉTICO, PLANTA, CÉLULA DE PLANTA, SEMENTE OU FRUTO, E, USO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO? A descrição fornece uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma 7-epizingibereno sintase, um gene quimérico que compreende a dita molécula de ácido nucleico, vetores que compreendem a mesma, assim como proteínas isoladas da própria 7-epizingibereno sintase. Além disso, plantas e células de planta transgênicas que compreendem um gene que codifica uma 7-epizingibereno sintase, opcionalmente integrada no seu genoma, e métodos para fabricar tais plantas e células, são fornecidas. Especialmente plantas Solanaceae e partes de planta (sementes, fruto, folhas, etc.) com resistência à praga de inseto realçada são fornecidas.

“GENE QUIMÉRICO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, USO DE UMA MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO E MÉTODO PARA PRODUZIR UMA PLANTA TRANSGÊNICA POSSUINDO RESISTÊNCIA AUMENTADA À PRAGA DE INSETO”.

5 CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma 7-epizingibereno sintase, um gene quimérico que compreende a dita molécula de ácido nucleico, vetores que compreendem o mesmo, células hospedeiras que compreendem tal vetor, assim como as próprias proteínas da zingibereno sintase isoladas. A presente invenção fornece ainda um método para preparar 7-epizingibereno usando tal molécula de ácido nucleico. Além disso, as plantas e células de planta transgênicas que compreendem um gene que codifica tal zingibereno sintase, opcionalmente integrada no seu genoma, e métodos para fabricar tais plantas e células, são fornecidos. Especialmente plantas e partes de planta *Solanaceae* (sementes, fruta, folhas, etc.) com resistência aumentada à praga de inseto são fornecidos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Algumas pragas de inseto comum de plantas de safra agronomicamente importantes tais como tomates incluem o Minerador da Folha do Tomate da América do Sul (*Tuta absoluta*), percevejos fedorentos, brocas, roscas, afídeos, lagartas do repolho, moscas brancas (*Bemisia* e *Trialeurodes*), gusano de frutas, besouros saltadores, ácaros aranha tais como *Tetranychus urticae* (o ácaro aranha vermelho das estufas), *Panonychus ulmi* (ácaro aranha vermelho das árvores frutíferas) e *Panonychus citri* (ácaro vermelho dos cítricos), insetos da ordem dos *Diptera*, e besouros da batata do Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*).

Por exemplo, as moscas brancas dos gêneros *Bemisia* (mosca branca da batata doce) e *Trialeurodes* (mosca branca da estufa) são pragas principais de plantas de safra por todo o mundo, causando perdas econômicas

especialmente devido à transmissão de vírus de planta durante a alimentação (isto é elas atuam como ‘vetores virais’). *Bemisia tabaci* é capaz de transmitir mais do que 60 membros diferentes da *Geminiviridae*, muitos dos quais pertencem aos Begomovírus tais como o vírus mosaico da mandioca africana (ACMV), vírus mosaico dourado do feijão (BGMV), vírus mosaico anão do feijão, vírus do encrespamento da folha amarela do tomate (TILCV), vírus mosqueado do tomate (ToMoV), e outros, mais vários crinivírus. As safras tanto tropical quanto temperada são afetadas, tais como tomates, feijões, cucurbitas, batatas, algodão, cassava e batatas doces.

Até agora, a estratégia de controle principal para as pragas de inseto é a aplicação de inseticidas, visando matar adultos, jovens e ovos. Além do custo substancial da aplicação de inseticida esta prática tem um grave impacto ambiental. Além disso, muitas pragas de inseto são difíceis de controlar com inseticidas devido à resistência emergente aos ingredientes ativos.

De modo a reduzir a aplicação de inseticida, existe uma necessidade quanto a novos modos de controlar o dano à safra e perdas devido às pragas de inseto das plantas, tanto nas safras cultivadas no campo quanto nas cultivadas em estufa. Da literatura é conhecido que os componentes voláteis podem diretamente influenciar o comportamento do inseto (por exemplo, Bruce *et al.*, 2005, Trends Plant Sci. 10: 269-74). Um modo para controlar a transmissão de vírus pelas pragas de inseto de planta é pela identificação de repelentes de inseto, que podem ser aplicados nas ou próximo das plantas de safra ou podem ser produzidos na safra.

A EP 0 583 774 descreve o uso de óleo vegetal para reduzir a fitotoxidez dos agentes de controle de inseto foliar, por meio do qual qualquer tipo de agente de controle de inseto pode ser usado.

Tricomas glandulares são proeminente na folhagem e hastes do gênero *Lycopersicon* (agora classificado como *Solanum*) e mostraram produzir um grande número de compostos secundários, tais como

hidrocarbonetos de mono- e sesquiterpenos, ácidos de sesquiterpeno, metilcetonas e ésteres de açúcar. Vários estudos tentaram correlacionar a densidade de tricomas glandulares com resistência contra pragas de planta, tais como gorgulho da espiga do milho (*Heliothis zea*) ou besouro da batata do Colorado (Kauffman e Kennedy, 1989, J Chem Ecol 15, 1919-1930; Antonious, 2001, J Environ Sci Health B 36, 835-848 e Antonious *et al.* 2005, J Environ Sci Health B 40: 619-631). Também as metilcetonas 2-undecanonas e 2-tridecanonas, armazenadas nos tricomas glandulares de *L. hirsutum f. glabratum* (renomeado para *S. habrochaites*) foram mostrados exibir um efeito tóxico contra as larvas do quarto instar do besouro da batata do Colorado e moscas brancas adultas *B. tabaci*, respectivamente (Antonious *et al.* 2005, J Environ Sci Health B 40: 619-631).

Antonious e Kochhar (J Environm Science and Health B, 2003, B38: 489-500) extraíram e quantificaram zingibereno e curcumeno dos acessos de tomate selvagem com a meta de selecionar acessos de tomate selvagem que possam ser usados para a produção de hidrocarbonetos de sesquiterpeno para a produção de inseticida natural. Entretanto, se tais compostos são capazes de serem usados como repelentes ou atraentes de mosca branca não foi descrito. É mencionado que zingibereno foi associado com a resistência ao besouro do Colorado e resistência à lagarta da beterraba, enquanto o curcumeno foi associado com efeitos inseticidas. A espécie de tomate do tipo selvagem *L. hirsutum f. typicum* (*S. habrochaites*) é mencionado ser resistente ao *B. argentifolii* (agora chamado de *B. tabaci*) (Heinz *et al.* 1995, 88: 1494-1502), mas a resistência de planta com base em tricoma, naturalmente, teria várias causas e conforme este documento não se pode fazer inferências com relação à presença ou identidade dos compostos que têm propriedades para atrair ou repelir moscas brancas.

Freitas *et al.* (Euphytica 2002, 127: 275-287) estudaram a herança genética dos genes para a produção tanto de sesquiterpeno

zingibereno quanto tricoma glandular tipos I, IV, VI e VII em cruzamentos interespecíficos entre *L. esculentum* (*S. lycopersicum*; tomate cultivado, sem zingibereno) e *L. hirsutum* var. *hirsutum* selvagem (*S. habrochaites*; alto em zingibereno). O teor de zingibereno em plantas F₂ contribuiu para a resistência ao

5 *B. argentifolii* (*B. tabaci*) pela correlação e foi sugerido cruzar plantas com níveis simultaneamente altos de zingibereno, 2-tridecanona e/ou acilaçúcares para contribuir para níveis mais altos de resistência à mosca branca.

A ES 2341085 descreve a aplicação exógena de alfa-zingibereno como um repelente e inseticida contra *T. absoluta* e outros insetos

10 que afetam as safras de tomate. O alfa-zingibereno pode ser aplicado na sua forma pura, ou na sua forma natural através do uso de óleos essenciais que contêm a molécula em concentrações apropriadas.

De Azavedo *et al.*, Euphytica 2003, 134, 247-351 descrevem o efeito da resistência mediada pelo zingibereno endógeno ao *T. absoluta*.

15 De acordo com Pushkar, N. K. e Balawant, S. J. (2001) “Alternative medicine: Herbal drugs and their critical appraisal” em Jucker, E. Progress in Drug Research, Vol. 57, o óleo essencial de gengibre contém alfa-zingibereno, mas não 7-epizingibereno (Tabela 4, página 46).

Bleeker *et al.*, Phytochemistry 2011, 72(1): 68-73 descrevem

20 que 7-epizingibereno e R-curcumeno, ambos purificados a partir de *Solanum habrochaites* (PI127826), atuam como repelente para moscas brancas de *Bemisia tabaci*, enquanto estereoisômeros de alfa-zingibereno e S-curcumeno a partir do óleo de *Zingiber officinalis* (óleo de gengibre) não. Os bioensaios mostraram que um tomate cultivado pode ser feito menos atrativo para *B.*

25 *tabaci* do que seus irmãos vizinhos pela adição do estereoisômero 7-epizingibereno do tomate ou seu derivado R-curcumeno (abstrato).

Davidovich-Rikanati *et al.*, The Plant Journal 2008, 56(2): 228-238 descrevem a transformação de plantas de tomate com uma construção que abriga a alfa-zingibereno sintase do manjerição limão

(*Ocimum basilicum* L.) ligado ao promotor da poligalacturonase (PG) do tomate específico do amadurecimento da fruta. A superexpressão da alfa-zingibereno sintase resulta na produção de alfa-zingibereno pelos tomates transgênicos. É descrito ainda que o alfa-zingibereno é um sesquiterpeno do óleo da folha principal em *Solanum hirsutum*, e este traço foi associado com resistência ao *B. tabaci*.

Iijima *et al.*, Plant Physiology 2004, 136(3): 3724-3736 descrevem a isolamento e expressão em *E. coli* de uma alfa-zingibereno sintase de manjerição doce.

Embora vários métodos existam para combater pragas de inseto de planta, existe ainda uma necessidade quanto à proteção adequada contra pragas de inseto tais como, por exemplo, *B. tabaci*.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Foi identificado agora um gene que codifica uma proteína da 7-epizingibereno sintase de *Solanum habrochaites* (ShZIS).

Assim, em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece uma proteína isolada que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido que compreende pelo menos 92 % de identidade da sequência de aminoácido com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 em relação ao comprimento inteiro. A presente invenção fornece ainda uma sequência de ácido nucleico isolada, sintética ou recombinante selecionada do grupo que compreende: a) uma sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 2; b) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1; c) uma sequência de ácido nucleico que é pelo menos 92 % idêntica às sequências de ácido nucleico de (a) ou (b), e codifica uma 7-epizingibereno sintase; d) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 em que pelo menos um aminoácido é substituído, deletado, inserido ou

adicionado e em que o polipeptídeo é funcionalmente equivalente ao polipeptídeo que consiste da sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1; e e) uma sequência de ácido nucleico que hibridiza sob condições severas com as sequências de ácido nucleico de (a), (b), ou (c), e codifica uma 7-epizingibereno sintase; um gene quimérico que compreende um promotor, opcionalmente ativo em células de planta, operacionalmente ligado a tal molécula de ácido nucleico, e, opcionalmente, operacionalmente ligado ainda a uma molécula de ácido nucleico 3' não traduzida, assim como um vetor que compreende tal gene quimérico. Uma célula hospedeira que compreende tal vetor também é incluída na presente invenção.

A presente invenção também é direcionada a um método para preparar 7-epizingibereno e/ou R-curcumeno que compreende as etapas de: a) transformar uma célula hospedeira com a molécula de ácido nucleico, um gene quimérico ou um vetor de acordo com a presente invenção; b) cultivar a dita célula hospedeira sob condições que permitem a produção de 7-epizingibereno; c) opcionalmente, isolar o 7-epizingibereno produzido na etapa b); e d) opcionalmente, desidrogenando o dito 7-epizingibereno para produzir R-curcumeno.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a um método para produzir 7-epizingibereno a partir de zFPP em uma célula hospedeira, que compreende: a) introduzir dentro da dita célula hospedeira uma primeira sequência de ácido nucleico que codifica uma zFPS como mostrado na SEQ ID NO: 6 ou uma sequência de aminoácido que compreende pelo menos 80 % de identidade de sequência de aminoácido com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 6 em relação ao comprimento inteiro, e uma segunda sequência de ácido nucleico que codifica uma 7-epizingibereno sintase que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido que compreende pelo menos 92 % de identidade de sequência de aminoácido com a sequência de aminoácido da

SEQ ID NO: 1; b) cultivar a célula hospedeira transformada em condições adequadas para a expressão da dita primeira e dita segunda sequências de ácido nucleico; e, c) opcionalmente, coletar a zFPP e/ou o 7-epizingibereno contidos na dita célula hospedeira e/ou no meio de cultura.

5 Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma planta transgênica, célula de planta, semente ou fruta, que compreendem uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido que compreende pelo menos 92 % de identidade de sequência de aminoácido com a sequência de aminoácido da
10 SEQ ID NO: 1 em relação ao comprimento inteiro.

 Já em um outro aspecto, a presente invenção refere-se a uma planta, célula de planta, semente ou fruta de *Solanum lycopersicum* que compreendem uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido que
15 compreende pelo menos 92 % de identidade de sequência de aminoácido com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 em relação ao comprimento inteiro. Preferivelmente, a dita planta, célula de planta, semente ou fruta de *Solanum lycopersicum* compreendem ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica uma Z,Z-farnesil-difosfato sintase (aqui também referida como
20 um “zFPP” ou Z,Z-FPP).

 Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método para produzir uma planta transgênica tendo resistência aumentada à praga de inseto comparado a uma planta de controle não transgênica, o dito método compreendendo as etapas de: (a) transformar um planta ou célula de planta
25 com uma molécula de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido que compreende pelo menos 92 % de identidade de sequência de aminoácido com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 em relação ao comprimento inteiro, operacionalmente ligada a um promotor ativo nas células de planta, e (b)

regenerar uma planta. A dita molécula de ácido nucleico pode ser integrada no genoma da dita planta. O dito método pode compreender ainda a etapa de (c) triar a planta regenerada, ou uma planta derivada desta pela autopolinização ou cruzamento, quanto a resistência a uma ou mais pragas de inseto e identificar uma planta que compreende resistência aumentada a uma ou mais das ditas pragas de inseto. O promotor pode ser um promotor indutível pela praga de inseto. A planta pode pertencer à família das *Solanaceae*. A planta pode ser do gênero *Solanum*.

Em um forma de realização, o método compreende ainda a etapa de transformar a planta ou célula de planta com uma molécula de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 5 ou uma sequência de aminoácido que compreende pelo menos 80 % de identidade de sequência de aminoácido com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 6, preferivelmente em relação ao comprimento inteiro, operacionalmente ligada a um promotor ativo nas células de planta.

Em um outro aspecto, a presente invenção refere-se ao uso de uma molécula de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido que compreende pelo menos 92 % de identidade de sequência de aminoácido com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 em relação ao comprimento inteiro para a geração de plantas de inseto resistentes a praga.

Em um aspecto final, a presente invenção refere-se a um método para identificar um polimorfismo genético entre *Solanum habrochaites* e espécies do tipo *Solanum* que são sexualmente compatíveis com o *Solanum habrochaites* que compreende detectar um polimorfismo genético com marcadores moleculares que compreendem todo ou parte do gene que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 92 % de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 de modo a controlar a

introgressão do gene correspondente na dita espécie.

DEFINIÇÕES GERAIS

O termo “molécula de ácido nucleico” (ou “sequência de ácido nucleico”) refere-se a uma molécula de DNA ou RNA na forma de filamento único ou duplo, particularmente um DNA que codifica uma proteína de acordo com a invenção. Uma “sequência de ácido nucleico isolado” refere-se a uma sequência de ácido nucleico que não está mais no ambiente natural do qual o mesmo foi isolado, por exemplo, a sequência de ácido nucleico em uma célula hospedeira bacteriana ou no genoma nuclear ou plastídio da planta.

Os termos “proteína” ou “polipeptídeo” são usados intercambiavelmente e refere-se às moléculas que consistem de uma cadeia de aminoácidos, sem referência a um modo específico de ação, tamanho, estrutura 3 dimensional ou origem. Uma “proteína isolada” é usada para se referir a uma proteína que não está mais no seu ambiente natural, por exemplo *in vitro* ou em uma célula hospedeira recombinante de bactéria ou planta.

O termo “7-epizingibereno sintase” ou “proteína de 7-epizingibereno sintase” como aqui usado indica uma proteína da 7-epizingibereno sintase, isto é, a proteína da invenção é capaz de converter Z,Z-farnesil-difosfato em 7-epizingibereno.

“Funcional”, em relação às proteínas de 7-epizingibereno sintase (ou variantes, tais como ortólogos ou mutantes, e fragmentos), refere-se à capacidade para fornecer resistência à praga de inseto pela modificação do nível de expressão do gene que codifica a 7-epizingibereno sintase em um planta.

O termo “gene” significa uma sequência de DNA que compreende uma região (região transcrita), que é transcrita em uma molécula de RNA (por exemplo, um mRNA) em uma célula, operacionalmente ligada às regiões reguladoras adequadas (por exemplo, um promotor). Um gene pode assim compreender várias sequências operacionalmente ligadas, tais como um promotor, uma sequência líder 5’ que compreende por exemplo, sequências

envolvidas no início de tradução, uma região codificadora (proteína) (cDNA ou DNA genômico), introns, e uma sequência 3' não traduzida que compreende por exemplo, sítios de terminação de transcrição.

Um “gene quimérico” (ou gene recombinante) refere-se a qualquer gene, que não é normalmente encontrado na natureza em uma espécie, em particular um gene no qual uma ou mais partes da sequência de ácido nucleico estão presentes que não estão associadas entre si na natureza. Por exemplo o promotor não está associado na natureza com parte ou toda da região transcrita ou com uma outra região reguladora. O termo “gene quimérico” é entendido incluir construções de expressão em que um promotor ou sequência reguladora de transcrição é operacionalmente ligada a uma ou mais sequências codificadoras ou a uma sequência de anti-sentido (complemento reverso do filamento de sentido) ou sequência de repetição invertida (de sentido e de anti-sentido, por meio da qual o transcrito de RNA forma RNA de filamento duplo na transcrição).

Uma “3' UTR” ou “sequência não traduzida 3'” (também frequentemente referida como região não traduzida 3', ou extremidade 3') refere-se à sequência de ácido nucleico encontrada a montante da sequência codificadora de um gene, que compreende por exemplo um sítio de terminação de transcrição e (na maioria, mas não em todos os mRNAs eucarióticos) um sinal de poliadenilação (tal como por exemplo, AAUAAA ou variantes do mesmo). Depois do término da transcrição, o transcrito de mRNA pode ser clivado a jusante do sinal poliadenilação e uma cauda poli(a) pode ser adicionada, que está envolvida no transporte do mRNA para o citoplasma (onde a tradução ocorre).

“Expressão de um gene” refere-se ao processo em que uma região de DNA, que é operacionalmente ligada às regiões reguladoras apropriadas, particularmente um promotor, é transcrito em um RNA, que é biologicamente ativo, isto é que é capaz de ser traduzido em uma proteína ou

peptídeo biologicamente ativos (ou fragmento de peptídeo ativo) ou que é ativo por si só (por exemplo, no silenciamento de gene pós-transcricionais ou RNAi). Uma proteína ativa em certas formas de realização refere-se a uma proteína que é constitutivamente ativa. A sequência codificadora está preferivelmente na orientação de sentido e codifica uma proteína ou peptídeo, biologicamente ativos, desejados ou um fragmento de peptídeo ativo. Nos métodos de silenciamento de gene, a sequência de DNA está preferivelmente presente na forma de um DNA de anti-sentido ou um DNA de repetição invertido, que compreende uma sequência curta do gene alvo na orientação anti-sentido ou na de sentido e anti-sentido. “Expressão ectópica” refere-se à expressão em um tecido no qual o gene normalmente não é expressado.

Uma “sequência reguladora de transcrição” é aqui definida como uma sequência de ácido nucleico que é capaz de regular a taxa de transcrição de uma sequência (codificadora) operacionalmente ligada à sequência reguladora de transcrição. Uma sequência reguladora de transcrição como aqui definida assim compreenderá todos os elementos da sequência necessários para o início da transcrição (elementos promotores), para manter e para regular a transcrição, incluindo por exemplo, atenuadores ou realçadores. Embora na maioria das vezes as sequências reguladoras de transcrição a montante (5’) de uma sequência codificadora sejam referidas, as sequências reguladoras encontradas a jusante (3’) de uma sequência codificadora também são abrangidas por esta definição.

Como aqui usado, o termo “promotor” refere-se a um fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar a transcrição de um ou mais genes, localizados a montante com relação à direção de transcrição do sítio de início de transcrição do gene, e é estruturalmente identificado pela presença de um sítio de ligação para a RNA polimerase dependente de DNA, sítios de início de transcrição e qualquer outra das sequências de DNA, incluindo, mas não limitado aos sítios de ligação do fator de transcrição, sítios

de ligação das proteínas repressora e ativadora, e qualquer outra das sequências de nucleotídeos conhecidas por uma pessoa de habilidade na técnica por atuar direta ou indiretamente para regular a quantidade de transcrição do promotor. Um promotor “constitutivo” é um promotor que é
5 ativo na maioria dos tecidos sob as condições mais fisiológicas e desenvolvimentais. Um promotor “indutível” é um promotor que é fisiologicamente (por exemplo, pela aplicação externa de certos compostos) ou desenvolvimentalmente regulado. Um promotor “específico de tecido” é apenas ativo em tipos específicos de tecidos ou células. Um “promotor ativo em plantas
10 ou células de planta” refere-se à capacidade geral do promotor para direcionar a transcrição dentro de uma planta ou célula de planta. O mesmo não faz nenhuma implicação a cerca da atividade espaçotemporal do promotor.

Como aqui usado, o termo “operacionalmente ligado” refere-se a uma ligação de elementos de polinucleotídeo em uma relação funcional.
15 Um ácido nucleico é “operacionalmente ligado” quando o mesmo é colocado dentro de uma relação funcional com uma outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor, ou ao invés uma sequência reguladora de transcrição, é operacionalmente ligado a uma sequência codificadora se ele afeta a transcrição da sequência codificadora. Operacionalmente ligado
20 significa que as sequências de DNA que estão ligadas são tipicamente contíguas.

O termo “peptídeo alvo” refere-se às sequências de aminoácido que alvejam uma proteína, ou fragmento de proteína, às organelas intracelulares tais como plastídios, preferivelmente cloroplastos, mitocôndria,
25 ou ao espaço extracelular ou apoplasto (peptídeo de sinal de secreção). Uma sequência de ácido nucleico que codifica um peptídeo alvo pode ser fundida (na matriz) à sequência de ácido nucleico que codifica a extremidade de terminal amino (extremidade de terminal N) da proteína ou fragmento de proteína, ou pode ser usada para substituir um peptídeo alvejador nativo.

Uma “construção de ácido nucleico” ou “vetor” são aqui entendidos significar uma molécula de ácido nucleico feita pelo ser humano que resulta do uso da tecnologia de DNA recombinante e que é usada para liberar DNA exógeno dentro de uma célula hospedeira. A cadeia principal do vetor por exemplo pode ser um vetor binário ou superbinário (ver por exemplo, a US 5591616, US 2002138879 e WO95/06722), um vetor cointegrado ou um vetor de T-DNA, como conhecido na técnica e como descrito aqui em outro lugar, dentro do qual está integrado um gene quimérico ou, se uma sequência reguladora de transcrição adequada já está presente, apenas uma sequência de ácido nucleico desejada (por exemplo, uma sequência codificadora, uma sequência de anti-sentido ou uma repetição invertida) é integrada a jusante da sequência reguladora de transcrição. Os vetores usualmente compreendem ainda elementos genéticos para facilitar o seu uso na clonagem molecular, tal como por exemplo, marcadores selecionáveis, sítios de clonagem múltipla e os semelhantes (ver abaixo).

“Condições de hibridização severa” podem ser usadas para identificar sequências de nucleotídeo, que são substancialmente idênticas a uma dada sequência de nucleotídeo. As condições severas são dependentes da sequência e será diferente em circunstâncias diferentes. No geral, as condições severas são selecionadas como sendo de cerca de 5°C mais baixas do que o ponto de fusão térmica (T_m) para as sequências específicas em uma concentração iônica e pH definidos. A T_m é a temperatura (sob concentração iônica e pH definidos) na qual 50 % da sequência alvo hibridiza a uma sonda perfeitamente emparelhada. Tipicamente as condições severas serão escolhidas em que a concentração salina é de cerca de 0,02 molar no pH 7 e a temperatura é de pelo menos 60°C. Diminuindo a concentração salina e/ou aumentando a temperatura aumenta a severidade. As condições severas para as hibridizações de RNA-DNA (Northern blots usando uma sonda por exemplo, de 100 nt) são por exemplo aquelas que incluem pelo menos uma lavagem em 0,2X SSC a 63°C por 20 min, ou condições

equivalentes. As condições severas para a hibridização de DNA-DNA (Southern blots usando uma sonda de por exemplo, 100 nt) são por exemplo aquelas que incluem pelo menos uma lavagem (usualmente 2) em 0,2X SSC em uma temperatura de pelo menos 50°C, usualmente de cerca de 55°C, por 20 min, ou condições equivalentes. Ver também Sambrook *et al.* (1989) e Sambrook e Russell (2001).

A “Identidade de sequência” e a “similaridade de sequência” podem ser determinadas pelo alinhamento de dois peptídeos ou duas sequências de nucleotídeo usando algoritmos de alinhamento global ou local.

As sequências podem ser depois referidas como “substancialmente idênticas” ou “essencialmente similares” quando elas (quando alinhadas de modo ideal por exemplo pelos programas GAP ou BESTFIT usando parâmetros de default) compartilham pelo menos uma certa porcentagem mínima de identidade de sequência (como definido abaixo). GAP usa o algoritmo de alinhamento global de Needleman e Wunsch para alinhar duas sequências em relação ao seu comprimento inteiro, maximizando o número de emparelhamentos e minimizando o número de intervalos. No geral, os parâmetros de default GAP são usados, com uma penalidade de criação de intervalo = 50 (nucleotídeos)/8 (proteínas) e penalidade de extensão de intervalo = 3 (nucleotídeos)/2 (proteínas). Para os nucleotídeos a matriz de marcação default usada é nwsgapdna e para as proteínas a matriz de marcação default é Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Os alinhamentos e contagens de sequência para a identidade de sequência percentual pode ser determinado usando programas de computador, tais como o GCG Wisconsin Package, Versão 10.3, disponível da Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752 USA, ou EmbossWin versão 2.10.0 (usando o programa “needle”). Alternativamente a similaridade ou identidade percentuais podem ser determinadas pela pesquisa contra bases de dados, usando algoritmos tais como FASTA, BLAST, etc. Preferivelmente, a

identidade de sequência refere-se à identidade de sequência em relação ao comprimento inteiro da sequência.

Uma “célula hospedeira” ou uma “célula hospedeira recombinante” ou “célula transformada” são termos que se referem a uma nova célula (ou organismo) individual que surge como um resultado de pelo menos uma molécula de ácido nucleico, que especialmente compreende um gene quimérico que codifica uma proteína desejada ou uma sequência de ácido nucleico que na transcrição produz um RNA de anti-sentido ou um RNA de repetição invertida (ou RNA grampo de cabelo) para o silenciamento de um gene/família de gene alvos, que foram introduzidos dentro da dita célula. A célula hospedeira é preferivelmente uma célula de planta ou uma célula bacteriana. A célula hospedeira pode conter a construção de ácido nucleico como uma célula que replica extra-cromossomicamente (epissômica), ou mais preferivelmente, compreende o gene quimérico integrado no genoma nuclear ou plastídico da célula hospedeira. Por todo o texto o termo “hospedeiro” também pode referir-se à espécie de planta hospedeira que um patógeno é capaz de invadir ou infectar, mas isto estará evidente a partir do contexto. As espécies de planta são classificadas como espécies “hospedeiras” ou “não hospedeiras” em relação a um patógeno. As espécies “não hospedeiras” são completamente imunes à infecção com patógeno de todas as raças ou cepas de um patógeno, mesmo sob condições ideais para o desenvolvimento de doença. As espécies “hospedeiras” também são referidas como a “faixa de hospedeiro” de um patógeno e são imunes a certas classes (mas não todas) de um patógeno.

O termo “marcador selecionável” é um termo familiar para uma pessoa de habilidade comum na técnica e é aqui usado para descrever qualquer entidade genética que, quando expressada, pode ser usada para selecionar quanto a uma célula ou células que contenham o marcador selecionável. Os produtos de gene do marcador selecionável conferem por

exemplo resistência a antibiótico, ou mais preferivelmente, resistência a herbicida ou um outro traço selecionável tal como um traço fenotípico (por exemplo, uma mudança na pigmentação) ou exigências nutricionais. O termo “repórter” é principalmente usado para se referir aos marcadores visíveis, tais como proteína fluorescente verde (GFP), eGFP, luciferase, GUS e os semelhantes.

Os termos “pragas” e “praga” como aqui usados referem-se às “pragas de inseto de planta” ou “pragas de planta” ou “pragas de inseto” ou “espécies de praga de planta”. Tais pragas de inseto de planta incluem espécies de inseto que causam infestação e dano na safra e/ou plantas ornamentais (espécies de planta hospedeira), pela infestação das plantas ou partes de planta. Uma “infestação” é a presença de um número grande de organismos de praga em uma área (por exemplo, um campo ou estufa), na superfície de uma planta hospedeira ou em qualquer coisa que possa contatar uma planta hospedeira, ou no solo. As pragas de inseto de planta incluem pragas de inseto que sugam seiva (ver abaixo), mas também outras pragas de inseto, tais como tripes, cigarra, e gafanhotos. O termo “pragas de inseto” como aqui usado inclui qualquer uma dos Artrópodes herbívoros tais como ácaros (por exemplo, ácaros aranha e outros).

“Pragas de inseto que sugam seiva” incluem pragas de planta da subordem *Sternorrhyncha* (da ordem *Hemiptera*, da classe *Insecta*), isto é pragas de inseto que incluem psílídeos, moscas brancas, afídeos, piolho farinhento e insetos de cochonilha e compartilham uma propriedade comum, a saber a utilização da seiva da planta como a sua fonte de alimento.

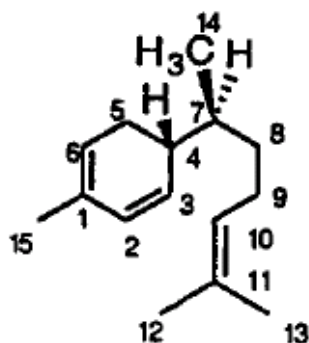
“Afídeos” incluem aqui pragas de inseto de planta da família *Aphididae*, tal como *Aphis gossypii*, *A. fabae*, *A. glicinas*, *A. nerii*, *A. nasturtii*, *Myzus persicae*, *M. cerasi*, *M. ornatus*, *Nasonovia* (por exemplo, *N. ribisnigri*), *Macrosiphum*, *Brevicoryne* e outros.

“Vetores de insetos” são insetos que são capazes de carregar e

transmitir vírus, bactérias, plasmódios etc. para as plantas.

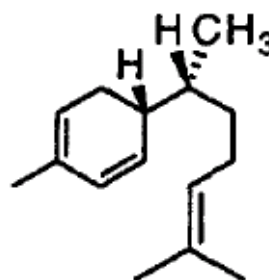
“Mosca branca” ou “moscas brancas” referem-se às espécies do gênero *Bemisia*, especialmente *B. tabaci* e *B. argentifolii* (também conhecida como biotipo B de *B. tabaci*), e/ou espécies do gênero
 5 *Trialeurodes*, especialmente *T. vaporariorum* (mosca branca de estufa) e *T. abutinoidea* (mosca branca de asa listrada). São aqui incluídos todos os biotipos, tais como biotipo Q e B de *B. tabaci*, assim como qualquer um dos estágios desenvolvimentais, tais como ovos, larvas, e adultos.

Por todo o pedido, referência é feita ao “7-epizingibereno”. A
 10 este respeito, é importante mencionar que 7-epizingibereno é um diastereoisômero de alfa-zingibereno (Breedon e Coates, 1994, Tetrahedron, 50 (38), 11123–11132). As duas moléculas diferem na configuração estereoquímica de um hidrogênio e um grupo metila:



Alfa - zingibereno

CAS 495-60-3



7-epizingibereno

CAS 158848-19-2

15

Quando exposto ao ar, o 7-epizingibereno isolado pode espontaneamente converter-se para R-curcumeno. Isto foi anteriormente observado por Bleeker *et al.* (Phytochemistry. Jan de 2011; 72(1): 68-73).

“*Solanaceae*” refere-se aqui aos gêneros, espécies, e
 20 variedades de planta do mesmo, pertencentes à família *Solanaceae*. Estas incluem espécies que pertencem ao gênero *Solanum* (incluindo *Solanum lycopersicum*, que usado ser conhecido como *Lycopersicon esculenta*), *Nicotiana*, *Capsicum*, *Petunia* e outros gêneros.

O termo “ortólogo” de um gene ou proteína refere-se aqui ao gene ou proteína homólogos encontrados em uma outra espécie, que tem a mesma função como o gene ou proteína, mas (usualmente) divergidos em sequência do ponto de tempo de quando a espécie abriga os genes divergidos (isto é os genes evoluídos de um ancestral comum pela especiação). Ortólogos do gene que codifica a zingibereno sintase de *Solanum habrochaites* da invenção podem ser assim identificados em outra espécie de planta com base tanto nas comparações de sequência (por exemplo, com base nas identidade de sequência percentuais em relação á sequência inteira ou em domínios específicos) e análise funcional.

Os termos “homólogo” e “heterólogo” referem-se às relações entre uma sequência de ácido nucleico ou aminoácido e a sua célula hospedeira ou organismo, especialmente no contexto de organismos transgênicos. Uma sequência homóloga é assim naturalmente encontrada na espécie hospedeiro (por exemplo, uma planta de tomate transformada com um gene de tomate), enquanto uma sequência heterólogo não é naturalmente encontrada na célula hospedeira (por exemplo, uma planta de tomate transformada com uma sequência de plantas de batata). Dependendo do contexto, o termo “homólogo” pode alternativamente referir-se às sequências que são descendentes de uma sequência ancestral comum (por exemplo, elas podem ser ortólogas).

Como aqui usado, o termo “planta” inclui células de planta, tecidos ou órgãos de planta, protoplastos de planta, culturas de tecido de célula de planta a partir dos quais as plantas podem ser regeneradas, calos de planta, massas de célula de planta, e células de planta que estão intactas nas plantas, ou partes de plantas, tais como embriões, pólen, óvulos, fruta (por exemplo, tomates colhidos), flores, folhas, sementes, raízes, pontas de raiz e os semelhantes.

Neste documento e nestas reivindicações, o verbo “compreender” e as suas conjugações são usadas no seu sentido não limitante

para significar que itens que seguem a palavra são incluídos, mas itens não especificamente mencionados não são excluídos. O mesmo também abrange o verbo mais limitante “consistir de”. Além disso, referência a um elemento pelos artigos indefinidos “um” ou “uma” não exclui a possibilidade de que mais do que um do elemento esteja presente, a menos que o contexto claramente requeira que exista um e apenas um dos elementos. Os artigos indefinidos “um” ou “uma” assim usualmente significam “pelo menos um”. É entendido ainda que, quando da referência às “sequências” aqui, no geral as moléculas físicas reais com uma certa sequência de subunidades (por exemplo, aminoácidos) são referidas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Proteínas e sequências de ácido nucleico

A proteína da 7-epizingibereno sintase da presente invenção tem 91 % de identidade de sequência em relação ao comprimento inteiro com uma proteína tendo a entrada no Banco de Gene ACJ38409.1 (710 dos 777 aminoácidos idênticos), a dita proteína sendo indicada como uma santaleno e bergamoteno sintase de *Solanum habrochaites*. A dita proteína é conhecida produzir (+)-alfa-santaleno, (-)-endo-alfa-bergomoteno e (+)-endo-beta-bergamoteno (Sallaud *et al.*, Plant Cell, vol. 21(1), 301-317, 2009 e US 2010-0138954).

Em uma forma de realização da invenção as sequências de ácido nucleico e sequências de aminoácido das proteínas da 7-epizingibereno sintase são fornecidas (incluindo ortólogos), assim como métodos para isolar ou identificar ortólogos das proteínas da 7-epizingibereno sintase em outras espécies de planta, tais como outra *Solanaceae*. As proteínas da 7-epizingibereno sintase e fragmentos funcionais e variantes da mesma, como aqui referido, são capazes de produzir 7-epizingibereno partindo de Z,Z-farnesildifosfato (“zFPP”). Assim, tais proteínas, assim como fragmentos funcionais e variantes das mesmas, têm a atividade da 7-epizingibereno sintase.

Em uma forma de realização as proteínas da 7-epizingibereno sintase são fornecidas. As “proteínas da 7-epizingibereno sintase” compreendem a proteína representada na SEQ ID NO: 1, assim como fragmentos e variantes da mesma. As variantes de 7-epizingibereno sintase incluem, por exemplo, proteínas tendo pelo menos 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,5 % ou mais, tal como 100 %, de identidade de sequência de aminoácido em relação ao comprimento inteiro da SEQ ID NO: 1. A identidade de sequência de aminoácido é determinada pelo alinhamento aos pares usando o algoritmo de Needleman e Wunsch e parâmetros de default GAP como definido acima. As variantes também incluem proteínas tendo atividade da 7-epizingibereno, que foi derivado, por via de uma ou mais substituições, deleções ou inserções de aminoácido, do polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1. Preferivelmente, tais proteínas compreendem de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais até cerca de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 substituições, deleções ou inserções de aminoácido. Por exemplo, e sem limitação, os aminoácidos que seguem podem ser substituídos: R10, P22, V42, K60, S90, N159, F190, I200, V298, A304, I310, V498, M504, S609, I626, F646. Por exemplo, e sem limitação, as substituições que seguem podem ser introduzidas: R10Q, P22T, V42L, K60N, S90T, N159S, F190V, I200M, V298A, A304V, I310M, V498M, M504I, S609T, I626L, F646C.

As variantes da 7-epizingibereno sintase podem ser obtidas a partir de várias fontes, tais como de outras espécies de planta (especialmente outras espécies de *Solanaceae*) ou outras variedades, ou elas podem ser fabricadas pela síntese *de novo*, mutagênese e os semelhantes. As proteínas da 7-epizingibereno sintase de acordo com a invenção podem ser assim isoladas a partir de fontes naturais, sintetizados *de novo* pela síntese química (usando por exemplo, um sintetizador de peptídeo tal como fornecido pela Applied

Biosystems) ou produzido pelas células hospedeiras recombinantes pela expressão da sequência de ácido nucleico que codifica a proteína da 7-epizingibereno sintase, fragmento ou variante. As variantes e fragmentos são preferivelmente funcionais, isto é, têm atividade da 7-epizingibereno sintase.

5 Quando a proteína da 7-epizingibereno sintase da presente invenção não é precedida por uma sequência alvejadora como descrito abaixo, a proteína da 7-epizingibereno sintase que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma variante da mesma como aqui definida será precedida por um resíduo de metionina, e a sequência de ácido nucleico que codificam tal
10 proteína, por exemplo, como representado na SEQ ID NO: 2, será precedida por um códon de partida. No caso a proteína da 7-epizingibereno sintase da presente invenção é precedida por uma sequência alvejadora, a dita metionina será codificada dentro do peptídeo alvejador.

As variantes da 7-epizingibereno sintase podem compreender
15 substituições de aminoácido conservativas dentro das categorias básica (por exemplo, Arg, His, Lys), ácida (por exemplo, Asp, Glu), não polar (por exemplo, Ala, Val, Trp, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp) ou polar (por exemplo, Gly, Ser, Thr, Tyr, Cys, Asn, Gln). Além disso, as substituições de aminoácido não conservativas caem dentro do escopo da invenção.

20 A funcionalidade de qualquer proteína da 7-epizingibereno sintase, variante ou fragmento, pode ser determinada usando vários métodos. Por exemplo, a superexpressão transitória ou estável em células de planta pode ser usada para testar se a proteína tem atividade, isto é fornece resistência aumentada à praga de inseto, *in planta*. A funcionalidade é
25 preferivelmente testada em *Solanum lycopersicum*. Assim, por exemplo a expressão transitória ou estável pode ser usada para determinar se a resistência à praga de inseto é aumentada, o que indica funcionalidade.

“Fragmentos” de proteínas da 7-epizingibereno sintase e de variantes de proteínas da 7-epizingibereno sintase, como descritos acima,

compreendem fragmentos de 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, aminoácidos contíguos ou mais, tais como 777. Preferivelmente, tais fragmentos são funcionais em tecido de planta, isto é eles são capazes de conferir ou realçar resistência à praga de inseto quando produzidos em células de planta.

5 Em uma outra forma de realização as sequências de ácido nucleico isoladas que codificam qualquer uma das proteínas, variantes ou fragmentos acima são fornecidos, tais como sequências de cDNA, DNA genômico e RNA. Devido à degenerescência do código genético várias sequências de ácido nucleico podem codificar a mesma sequência de
10 aminoácido. Qualquer sequência de ácido nucleico que codifica proteínas da 7-epizingibereno sintase ou variantes da mesma são aqui referidas como “sequências que codificam a 7-epizingibereno sintase”. As sequências de ácido nucleico fornecidas incluem as sequências de ácido nucleico que ocorrem naturalmente, artificiais ou sintéticas. Uma tal sequência de ácido
15 nucleico que codifica uma proteína da 7-epizingibereno sintase é fornecida na SEQ ID NO: 2. É entendido que quando as sequências são representadas como sequências de DNA enquanto RNA é referido, a sequência base real da molécula de RNA é idêntica com a diferença que timina (T) é substituída por uracila (U).

20 Também são incluídas variantes e fragmentos de sequências de ácido nucleico que codificam a 7-epizingibereno sintase, tais como sequências de ácido nucleico que hibridizam com as sequências de ácido nucleico que codificam a 7-epizingibereno sintase sob condições de hibridização severas como definido. As variantes de sequências de ácido nucleico que codificam a 7-epizingibereno
25 sintase também incluem sequências de ácido nucleico que têm uma identidade de sequência para a SEQ ID NO: 2 (em relação ao comprimento inteiro) de pelo menos 96,5 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % ou mais. Está claro que muitos métodos podem ser usados para identificar, sintetizar ou isolar variantes ou fragmentos de sequências de ácido nucleico que codificam a 7-epizingibereno

sintase, tal como a hibridização de ácido nucleico, tecnologia de PCR, análise *in silico* e síntese de ácido nucleico, e os semelhantes.

A sequência de ácido nucleico, particularmente a sequência de DNA, que codifica as proteínas da 7-epizingibereno sintase desta invenção
5 pode ser inserida em vetores de expressão para produzir quantidades altas de proteínas da 7-epizingibereno sintase, como descrito abaixo. Para a expressão ótima em um hospedeiro as sequências de DNA que codificam a 7-epizingibereno sintase pode ser otimizada no códon pela adaptação do uso do códon para aquele mais preferido nos genes do hospedeiro (tal como planta).
10 No caso do hospedeiro ser uma planta, o uso do códon pode ser adaptado particularmente para os genes nativos do gênero ou espécie da planta de interesse (Bennetzen & Hall, 1982, J. Biol. Chem. 257, 3026-3031; Itakura *et al.*, 1977 Science 198, 1056-1063.) usando tabelas do uso de códon disponíveis (por exemplo, mais adaptadas para a expressão em algodão, soja,
15 milho ou arroz). As tabelas de uso do códon para várias espécies de plantas são publicados por exemplo por Ikemura (1993, Em “Plant Molecular Biology Labfax”, Croy, ed., Bios Scientific Publishers Ltd.) e Nakamura *et al.* (2000, Nucl. Acids Res. 28, 292) e nas bases de dados de sequência de DNA principais (por exemplo, EMBL em Heidelberg, Alemanha).
20 Consequentemente, as sequências de DNA sintéticas podem ser construídas de modo que as mesmas ou substancialmente as mesmas proteínas são produzidas. Várias técnicas para modificar o uso do códon para aquele preferido pelas células hospedeiras podem ser encontradas na literatura de patente e científica. O método exato de modificação do uso de códon não é
25 crítico para esta invenção.

Pequenas modificações para uma sequência de DNA tal como descritas acima podem ser rotineiramente feitas, isto é, pela mutagênese mediada pela PCR (Ho *et al.*, 1989, Gene 77, 51-59., White *et al.*, 1989, Trends in Genet. 5, 185-189).

“Fragmentos” de sequências de ácido nucleico que codificam a 7-epizingibereno sintase incluem fragmentos de pelo menos 10, 12, 15, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ou mais nucleotídeos consecutivos da SEQ ID NO: 2, ou de variantes da SEQ ID NO: 2. Fragmentos curtos, por exemplo, podem ser usados como iniciadores de PCR ou sondas de hibridização.

Em uma outra forma de realização da invenção os iniciadores de PCR e/ou sondas e kits para detectar a 7-epizingibereno sintase que codificam sequências de DNA ou RNA são fornecidos. Os pares de iniciador de PCR degenerados ou específicos para amplificar o DNA que codifica a 7-epizingibereno sintase a partir de amostras podem ser sintetizados com base na SEQ ID NO: 2 (ou variantes do mesmo) como conhecido na técnica (ver Dieffenbach e Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e McPherson *et al.* (2000) PCR-Basics: From Background to Bench, Primeira Edição, Springer Verlag, Alemanha). Por exemplo, qualquer trecho de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18 ou mais nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 2 (ou o filamento de complemento) pode ser usado como iniciador ou sonda. Do mesmo modo, fragmentos de DNA da SEQ ID NO: 2 (ou variantes da mesma) podem ser usados como sondas de hibridização. Um kit de detecção para as sequências que codificam a 7-epizingibereno sintase pode compreender iniciadores específicos para as sequências que codificam a 7-epizingibereno sintase e/ou sondas específicas para as sequências que codificam a 7-epizingibereno sintase, e um protocolo associado para o uso dos iniciadores ou sonda para detectar sequências de DNA codificadoras específicas para a zingibereno sintase em uma amostra. Um tal kit de detecção, por exemplo, pode ser usado para determinar, se uma planta foi transformada com um gene codificador específico para a 7-epizingibereno sintase (ou parte do mesmo) da invenção. Por causa da degenerescência do código genético, alguns códons de aminoácido podem ser

substituídos por outros sem mudar a sequência de aminoácido da proteína.

Já em uma outra forma de realização um método para identificar e usar ortólogos ou alelos do gene que codifica a 7-epizingibereno sintase de *Solanum habrochaites* (SEQ ID NO: 2) é fornecido. O método
5 compreende as etapas de:

a) obter ou identificar uma sequência de ácido nucleico que compreende pelo menos 96,5 % de identidade de ácido nucleico com a SEQ ID NO: 2 (ou uma porcentagem mais alta de identidade de sequência, como indicado acima),

10 b) usar a sequência de ácido nucleico de a) para gerar os vetores de expressão e/ou silenciamento,

c) usar um ou mais vetores de b) para transformar uma planta ou célula(s) de planta, preferivelmente da espécie de planta a partir da qual o ácido nucleico foi obtido,

15 d) analisar a capacidade da planta/tecido de planta transformados para resistência à praga de modo a determinar ou verificar a função do gene *in planta* e/ou para gerar plantas transgênicas tendo resistência à praga de inseto aumentada;

e) opcionalmente, selecionar aqueles alelos ou ortólogos para
20 uso posterior que confere resistência aumentada à praga à planta transgênica.

Genes quiméricos, vetores de expressão, células hospedeiras e organismos recombinantes

Em uma forma de realização da invenção as sequências de ácido nucleico que codificam as proteínas da 7-epizingibereno sintase
25 (incluindo variantes ou fragmentos), como descrito acima, são usadas para fabricar genes quiméricos, e vetores que compreendem os mesmos para transferência do gene quimérico dentro de uma célula hospedeira e produção da(s) proteína(s) da 7-epizingibereno sintase em células hospedeiras, tais como células, tecidos, órgãos ou organismos derivados de célula(s)

transformada(s). Em uma forma de realização vantajosa, a produção de 7-epizingibereno sintase é utilizada para a produção de 7-epizingibereno. Os vetores para a produção de proteína da 7-epizingibereno sintase (ou fragmentos ou variantes de proteína) em células de planta são aqui referidos
5 como “vetores de expressão”.

As células hospedeiras adequadas para a expressão de polipeptídeos tais como 7-epizingibereno sintase incluem procariotas, levedura, ou células eucarióticas superiores. Os vetores de clonagem e expressão apropriados para o uso com hospedeiros celulares bacterianos, fúngicos,
10 de levedura, e de mamífero são descritos, por exemplo, em Pouwels *et al.*, Cloning vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., (1985). Os sistemas de tradução isentos de célula também podem ser utilizados para produzir as proteínas da presente invenção usando RNAs derivados de sequências de ácido nucleico aqui descritas. Em uma forma de realização, a dita célula hospedeira
15 (super)produz farnesil-difosfato (também referido como “FPP”). Em uma forma de realização adequada, dita célula hospedeira produz ou superproduz 2Z,6Z-farnesildifosfato (também referido como “Z,Z-farnesil pirofosfato” ou “zFPP”). A pessoa habilitada é capaz de superproduzir o substrato da 7-epizingibereno sintase da presente invenção para produzir 7-epizingibereno.

20 As células hospedeiras procarióticas adequadas incluem organismos gram-negativos e gram-positivos, por exemplo, *Escherichia coli* ou *Bacilli*. Uma outra célula hospedeira procariótica adequada é *Agrobacterium*, em particular *Agrobacterium tumefaciens*.

As proteínas da presente invenção também podem ser expressadas
25 em células hospedeiras de levedura, por exemplo a partir do gênero *Saccharomyces* (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*). Outros gêneros de levedura, tais como *Pichia* ou *Kluyveromyces*, também podem ser utilizados.

Alternativamente, as proteínas da presente invenção podem ser expressadas em células hospedeiras eucarióticas superiores, incluindo células

de planta, células fúngicas, células de inseto, e células de mamífero, opcionalmente não humanas.

Uma forma de realização da invenção é um organismo não humano modificado para compreender uma sequência de ácido nucleico da presente invenção. O organismo e/ou célula hospedeira não humanos podem ser modificados por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica para a transferência de gene incluindo, por exemplo, o uso de dispositivos de liberação tais como lipídeos e vetores virais, DNA nu, eletroporação, métodos químicos e transferência de gene mediada por partícula. Em uma forma de realização vantajosa, o organismo não humano é uma planta.

Qualquer planta pode ser um hospedeiro adequado, tal como plantas monocotiledôneas ou dicotiledôneas, mas o mais preferivelmente a planta hospedeira pertence à família *Solanaceae*. Por exemplo, a planta pertence ao gênero *Solanum* (incluindo *Lycopersicon*), *Nicotiana*, *Capsicum*, *Petunia* e outros gêneros. As espécies hospedeiras que seguem podem ser adequadamente usadas: Tabaco (espécie *Nicotiana*, por exemplo, *N. benthamiana*, *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum*, etc.), espécie vegetal, tal como tomate (*L. esculentum*, syn. *Solanum lycopersica*) tal como por exemplo, tomate cereja, var. *cerasiforme* ou tomate groselha, var. *pimpinellifolia*) ou tomate arbóreo (*S. betaceum*, syn. *Cyphomandra betaceae*), batata (*Solanum tuberosa*), berinjela (*Solanum melongena*), pepino (*Solanum muricata*), manacubio (*Solanum sessiliflora*) e naranjilha (*Solanum quitoense*), pimentões (*Capsicum annuum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum baccata*), espécies ornamentais (por exemplo, *Petunia hybrida*, *Petunia axillaries*, *P. integrifolia*), café (*Coffea*).

Alternativamente, a planta pode pertencer a qualquer outra família, tal como à *Cucurbitaceae* ou *Gramineae*. As plantas hospedeiras adequadas incluem por exemplo milho (espécie *Zea*), trigo (espécie *Triticum*), cevada (por exemplo, *Hordeum vulgare*), aveia (por exemplo, *Avena sativa*),

sorgo (*Sorghum bicolor*), centeio (*Secale cereale*), soja (*Glicina* spp, por exemplo, *G. max*), algodão (espécie *Gossypium*, por exemplo, *G. hirsutum*, *G. barbadense*), *Brassica* spp. (por exemplo, *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa*, etc), girassol (*Helianthus annuus*), açafrão, inhame, mandioca, alfafa

5 (*Medicago sativa*), arroz (espécie *Oryza*, por exemplo, *O. sativa* grupo de cultivar *indica* ou grupo de cultivar *japonica*), gramas forrageiras, mexoeira (*Pennisetum* spp. por exemplo, *P. glauca*), espécie arbórea (*Pinus*, álamo, abeto, banana da terra, etc), chá, café, dendê, coco, espécies vegetais, tais como ervilha, abrobrinha, feijões (por exemplo, espécie *Phaseolus*), pepino,

10 alcachofra, aspargo, brócoli, alho, alho-poró, alface, cebola, rabanete, nabo, couve de Bruxelas, cenoura, couve-flor, chicória, aipo, espinafre, endívia, funcho, beterraba, plantas que carregam frutas carnudas (uvas, pêssegos, ameixas, morango, manga, maçã, ameixa, cereja, damasco, banana, amora, mirtilo, cítricos, kiwi, figos, limão, lima, nectarinas, framboesa, melancia,

15 laranja, toranja, etc.), espécies ornamentais (por exemplo, espécies de Rosa, Petúnia, Crisântemo, Lírio, Gerbera), ervas (menta, salsa, manjerição, tomilho, etc.), árvores lenhosas (por exemplo, espécies de Choupo, Salgueiros, carvalho, Eucalipto), espécies fibrosas por exemplo, linho (*Linum usitatissimum*) e cânhamo (*Cannabis sativa*), ou organismos modelo, tais como

20 *Arabidopsis thaliana*.

Os hospedeiros preferidos são “plantas de safra” ou “plantas cultivadas”, isto é espécies de planta que são cultivadas e cruzadas pelos seres humanos. Uma planta de safra pode ser cultivada para propósitos de alimento ou ração (por exemplo, safras de campo), ou para propósitos ornamentais (por

25 exemplo, produção de flores para corte, gramas para gramados, etc.). Uma planta de safra como aqui definida também inclui plantas das quais produtos não alimentícios são colhidos, tais como óleo para combustível, polímeros plásticos, produtos farmacêuticos, cortiça, fibras (tais como algodão) e os semelhantes.

A construção de genes e vetores quiméricos para a introdução,

preferivelmente estável, das sequências de ácido nucleico de proteína de 7-epizingibereno sintase codificadoras dentro do genoma de células hospedeiras é no geral conhecida na técnica. Para gerar um gene quimérico a sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína da 7-epizingibereno sintase (ou variante ou fragmento do mesmo) é operacionalmente ligada a uma sequência promotora, adequada para a expressão nas células hospedeiras, usando técnicas da biologia molecular padrão. A sequência promotora pode já estar presente em um vetor de modo que a sequência de ácido nucleico da 7-epizingibereno sintase é simplesmente inserida dentro do vetor a jusante da sequência promotora. O vetor é depois usado para transformar as células hospedeiras e o gene quimérico é inserido no genoma nuclear ou dentro do plastídio, genoma mitocondrial ou cloroplasto e aí expressado usando um promotor adequado (por exemplo, Mc Bride *et al.*, 1995 Bio/Technology 13, 362; US 5.693.507). Em uma forma de realização um gene quimérico compreende um promotor adequado para a expressão em células de planta ou células microbianas (por exemplo, bactérias), operacionalmente ligadas a uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína da 7-epizingibereno sintase de acordo com a invenção, opcionalmente seguida por uma sequência de ácido nucleico 3'-não traduzida. As bactérias podem ser subsequentemente usadas para a transformação de planta (transformação de planta mediada pela *Agrobacterium*).

A sequência de ácido nucleico da 7-epizingibereno sintase, preferivelmente um gene quimérico da 7-epizingibereno sintase, que codifica uma proteína funcional da 7-epizingibereno sintase pode ser estavelmente inserido em uma maneira convencional dentro do genoma nuclear de uma única célula de planta, e a célula de planta assim transformada pode ser usada em uma maneira convencional para produzir uma planta transformada que tem um fenótipo alterado devido à presença da proteína da 7-epizingibereno sintase em certas células em um certo tempo. A este respeito, um vetor de T-

DNA, que compreende uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína da zingibereno sintase, em *Agrobacterium tumefaciens* pode ser usada para transformar a célula de planta, e depois disso, uma planta transformada pode ser regenerada a partir da célula de planta transformada usando os procedimentos descritos, por exemplo, na EP 0 116 718, EP 0 270 822, publicação PCT WO84/02913 e pedido de Patente Europeu publicado EP 0 242 246 e em Gould *et al.* (1991, Plant Physiol. 95, 426-434). A construção de um vetor de T-DNA para transformação de planta mediada por *Agrobacterium* é bem conhecida na técnica. O vetor de T-DNA pode ser um vetor binário como descrito na EP 0 120 561 e EP 0 120 515 ou um vetor cointegrado que pode integrar dentro do Ti-plasmídeo da *Agrobacterium* pela recombinação homóloga, como descrito na EP 0 116 718.

Os vetores de T-DNA preferidos cada um contém um promotor operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase (por exemplo, que codifica a SEQ ID NO: 2) entre as sequências limítrofes de T-DNA, ou pelo menos localizadas à esquerda da sequência limítrofe direita. As sequências limítrofes são descritas em Gielen *et al.* (1984, EMBO J 3, 835-845). Naturalmente, outros tipos de vetores podem ser usados para transformar a célula de planta, usando procedimentos tais como transferência de gene direta (como descrito, por exemplo na EP 0 223 247), transformação mediada por pólen (como descrito, por exemplo na EP 0 270 356 e WO85/01856), transformação com protoplasto como, por exemplo, descrito na US 4.684.611, transformação mediada por vírus de RNA de planta (como descrito, por exemplo na EP 0 067 553 e US 4.407.956), transformação mediada por lipossoma (como descrito, por exemplo na US 4.536.475), e outros métodos. Para a transformação de tomate ou tabaco ver também An G. *et al.*, 1986, Plant Physiol. 81: 301-305; Horsch R. B. *et al.*, 1988, Em: Plant Molecular Biology Manual A5, Dordrecht, Países Baixos, Kluwer Academic Publishers. pp 1-9;

Koornneef M. *et al.*, 1986, Em: Nevins D. J. e R. A. Jones, eds. *Tomato Biotechnology*, Nova Iorque, NY, USA, Alan R. Liss, Inc. pp 169-178). Para a transformação de batata ver por exemplo, Sherman e Bevan (1988, *Plant Cell Rep.* 7: 13-16).

5 Do mesmo modo, a seleção e regeneração de plantas transformadas a partir de células transformadas são bem conhecidas na técnica. Obviamente, para espécies diferentes e mesmo para variedades ou cultivares diferentes de uma única espécie, os protocolos são especificamente adaptados para regenerar transformantes em alta frequência.

10 Além da transformação do genoma nuclear, também a transformação do genoma plastídico, preferivelmente genoma de cloroplasto, é incluída na invenção. Uma vantagem da transformação do genoma plastídico é que o risco de disseminação do(s) transgene(s) pode ser reduzida. A transformação do genoma plastídico pode ser realizada como conhecido na
15 técnica, ver por exemplo, Sidorov VA *et al.* 1999, *Plant J*, 19: 209-216 ou Lutz KA *et al.* 2004, *Plant J.* 37(6): 906-13.

 A planta transformada resultante pode ser usada em um esquema de reprodução de planta convencional para produzir mais plantas transformadas que contenham o transgene. Os transformantes de cópia única
20 podem ser selecionados, usando por exemplo, a análise de Southern Blot ou métodos com base na PCR ou o ensaio Invader® Technology (Third Wave Technologies, Inc.). Alternativamente, a quantidade de 7-epizingibereno pode ser determinada usando métodos analíticos tais como GC-MS. As células e plantas transformadas podem ser facilmente distinguidas daquelas não
25 transformadas pela presença do gene quimérico. As sequências do DNA da planta que flanqueiam o sítio de inserção do transgene também podem ser sequenciadas, por meio da qual um método de detecção “Específico de Evento” pode ser desenvolvido, para o uso de rotina. Ver por exemplo a WO0141558, que descreve kits de detecção de evento de elite (tais como os

kits de detecção pela PCR) com base por exemplo na sequência integrada e na sequência flanqueadora (genômica).

A sequência de ácido nucleico da 7-epizingibereno sintase pode ser inserida em um genoma de célula de planta de modo que a sequência codificadora inserida esteja a jusante (isto é 3') do, e sob o controle de, um promotor que pode direcionar a expressão na célula de planta. Isto é preferivelmente realizado pela inserção do gene quimérico no genoma da célula de planta, particularmente no genoma nuclear ou plastídico (por exemplo, cloroplasto).

Visto que a produção constitutiva da proteína da 7-epizingibereno sintase pode levar à indução da morte da célula e/ou pode diminuir o rendimento (ver por exemplo, Rizhsky e Mittler, *Plant Mol Biol*, 2001 46: 313-23), em uma forma de realização é preferido usar um promotor cuja atividade é indutível. Os exemplos de promotores indutíveis são promotores indutíveis por ferimento, tal como o promotor MPI descrito por Cordera *et al.* (1994, *The Plant Journal* 6, 141), que é induzido por ferimento (tal como causado por inseto ou ferimento físico), ou o promotor COMPTII (WO0056897) ou o promotor PR1 descrito na US6031151. Alternativamente o promotor pode ser indutível por um produto químico, tal como dexametasona como descrito por Aoyama e Chua (1997, *Plant Journal* 11: 605-612) e na US6063985 ou pela tetraciclina (promotor TOPFREE ou TOP 10, ver Gatz, 1997, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48: 89-108 e Love *et al.* 2000, *Plant J.* 21: 579-88). Outros promotores indutíveis são por exemplo indutíveis por uma mudança na temperatura, tal como o promotor de choque térmico descrito na US 5.447.858, pelas condições anaeróbicas (por exemplo, o promotor ADH1S do milho), pela luz (US6455760), pelos patógenos (por exemplo, o promotor *gstI* da EP759085 ou o promotor *vstI* da EP309862) ou pela senescência (SAG12 e SAG13, ver a US5689042). Obviamente, existe uma faixa de outros promotores disponíveis.

Em uma forma de realização, preferivelmente, um promotor indutível pela praga de inseto é usado, visto que deste modo a proteína da 7-epizingibereno sintase (ou variante ou fragmento) será apenas produzido a seguir do ataque da praga de inseto do tecido de planta. Especialmente, os promotores de genes que são regulados por regulação positiva rapidamente depois do ataque da praga de inseto são desejados. Os promotores indutíveis por uma praga de inseto de planta particular também podem ser identificados usando métodos conhecidos, tais como cDNA-AFLP®.

Preferivelmente, o promotor é indutível por várias pragas de inseto, isto é, ele é indutível por uma ampla faixa de pragas de inseto da planta hospedeira. Para cada espécie de planta hospedeira particular, um promotor diferente pode ser o mais adequado. Por exemplo, quando tomate é usado como um hospedeiro, o promotor é preferivelmente induzido em pelo menos um, mas preferivelmente mais do que uma praga de inseto do tomate. Especialmente, um promotor que é indutível em uma ou mais pragas de inseto é preferido.

As descrições detalhadas de pragas de inseto de planta, dos sintomas de doença causada por eles e seus ciclos de vida podem ser encontrados para cada espécie de planta. Por exemplo, as pragas de inseto de tomate são descritas em “Compendium of Tomato Diseases”, Editores Jones, Jones, Stall e Zitter, ISBN 0-89054-120-5, APS Press (<http://www.shopapspress.org>).

Alternativamente, uma planta hospedeira pode compreender vários transgenes da 7-epizingibereno sintase, cada um sob o controle de um promotor indutível de praga diferente, para garantir que a proteína da 7-epizingibereno sintase é produzida a seguir do ataque por uma variedade de pragas de inseto. Por exemplo, para a transformação de tomate, um promotor pode ser indutível pela mosca branca e um promotor pode ser indutível pelos afídeos.

A palavra “indutível” não necessariamente requer que o promotor seja completamente inativo na ausência do estímulo indutor. Uma

atividade não específica de nível baixo pode estar presente, contanto que isto não resulte em penalidades de rendimento ou qualidade severas das plantas. Indutível, assim, preferivelmente refere-se a um aumento na atividade do promotor, resultando em um aumento na transcrição da região que codifica a zingibereno sintase a jusante que segue o contato com o indutor.

Em uma outra forma de realização promotores constitutivos podem ser usados, tais como os promotores 35S constitutivos fortes ou promotores 35S realçados (os “promotores 35S”) do vírus mosaico da couve flor (CaMV) de isolados CM 1841 (Gardner *et al.*, 1981, Nucleic Acids Research 9, 2871-2887), CabbB-S (Franck *et al.*, 1980, Cell 21, 285-294) e CabbB-JI (Hull e Howell, 1987, Virology 86, 482-493); o promotor 35S descrito por Odell *et al.* (1985, Nature 313, 810-812) ou em US5164316, promotores da família da ubiquitina (por exemplo, o promotor da ubiquitina do milho de Christensen *et al.*, 1992, Plant Mol. Biol. 18, 675-689, EP 0 342 926, ver também Cornejo *et al.* 1993, Plant Mol. Biol. 23, 567-581), o promotor gos2 (de Pater *et al.*, 1992 Plant J. 2, 834-844), o promotor emu (Last *et al.*, 1990, Theor. Appl. Genet. 81, 581-588), promotores da actina de Arabidopsis tal como o promotor descrito por An *et al.* (1996, Plant J. 10, 107.), promotores da actina do arroz tal como o promotor descrito por Zhang *et al.* (1991, The Plant Cell 3, 1155-1165) e o promotor descrito na US 5.641.876 ou o promotor da actina 2 do arroz como descrito na WO070067; promotores do vírus mosaico da nervura da mandioca (WO 97/48819, Verdaguer *et al.* 1998, Plant Mol. Biol. 37, 1055-1067), a série pPLEX de promotores do Vírus do Nanismo do Trevo Subterrâneo (WO 96/06932, particularmente o promotor do S7), um promotor da álcool desidrogenase, por exemplo, pAdh1S (números de acesso no Banco de Gene X04049, X00581), e o promotor TR1’ e o promotor TR2’ (o “promotor TR1” e “promotor TR2”, respectivamente) que direciona a expressão dos genes 1’ e 2’, respectivamente, do T-DNA (Velten *et al.*, 1984, EMBO J 3, 2723-2730), o

promotor do Vírus Mosaico da Escrofulária descrito na US6051753 e na EP426641, promotores do gene da histona, tal como o promotor Ph4a748 de *Arabidopsis* (PMB 8: 179-191), ou outros.

Alternativamente, um promotor pode ser utilizado que não é constitutivo mas ao invés é específico para um ou mais tecidos ou órgãos da planta (preferido de tecido/específico de tecido, incluindo promotores regulados pelo desenvolvimento), por exemplo preferido de folha, preferido de epiderme, preferido de raiz, tecido de flor por exemplo, preferido de *tapetum* ou antera, preferido de semente, preferido de vagem, etc.), ou promotores específicos de tricoma tais como MTS1 e MSK1 como descritos na WO2009082208, por meio dos quais o gene da 7-epizingibereno sintase é expressado apenas em células do(s) tecido(s) ou órgãos(s) específicos e/ou apenas durante um certo estágio de desenvolvimento. Por exemplo, o(s) gene(s) da 7-epizingibereno sintase pode(m) ser seletivamente expressado(s) nas folhas de uma planta pela colocação da sequência codificadora sob o controle de um promotor indutível por luz tal como o promotor do gene da subunidade pequena da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase da própria planta ou de uma outra planta, tal como ervilha, como descrito na US 5.254.799 ou *Arabidopsis* como descrito na US5034322.

Em uma forma de realização o promotor do gene da 7-epizingibereno sintase de *Solanum habrochaites* (espécie de tomate selvagem) fornecido pela presente invenção é usado. Por exemplo, o promotor do gene da 7-epizingibereno sintase de *S. habrochaites* pode ser isolado e operacionalmente ligado à região codificadora que codifica a proteína da zingibereno sintase da SEQ ID NO: 1. O promotor do gene da 7-epizingibereno sintase (a região reguladora da transcrição a montante da SEQ ID NO: 2) pode ser isolado de plantas *S. habrochaites* usando métodos conhecidos, tais como TAIL-PCR (Liu *et al.* 1995, Genomics 25(3): 674-81; Liu *et al.* 2005, Methods Mol Biol. 286: 341-8), Ligante-PCR, ou PCR Inversa (IPCR).

A sequência codificadora da 7-epizingibereno sintase é preferivelmente inserida dentro do genoma da planta de modo que a sequência codificadora esteja a montante (isto é 5') da região não traduzida da extremidade 3' adequada ("extremidade 3'" ou 3'UTR). As extremidades 3' adequadas incluem aquelas do gene CaMV 35S ("3' 35S"), o gene da nopalina sintase ("3' nos") (Depicker *et al.*, 1982 J. Molec. Appl. Genetics 1, 561-573.), o gene da octopina sintase ("3'ocs") (Gielen *et al.*, 1984, EMBO J 3, 835-845) e o gene T-DNA 7 ("3' gene 7") (Velten e Schell, 1985, Nucleic Acids Research 13, 6981-6998), que atuam como sequências de DNA 3'-não traduzidas em células de planta transformadas, e outras. Em uma forma de realização a 3'UTR do gene da 7-epizingibereno sintase de tomate de *Solanum habrochaites* (espécie de tomate selvagem) é usada. Introdução do vetor de T-DNA em *Agrobacterium* pode ser realizada usando métodos conhecidos, tal como eletroporação ou acasalamento triparental.

Uma sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase pode ser opcionalmente inserida no genoma da planta como uma sequência de gene híbrido por meio da qual a sequência da 7-epizingibereno sintase é ligada na matriz a um (US 5.254.799; Vaeck *et al.*, 1987, Nature 328, 33-37) gene que codifica um marcador selecionável ou marcador realçável, tal como por exemplo o gene neo (ou nptII) (EP 0 242 236) que codifica a resistência à canamicina, de modo que a planta expresse uma proteína de fusão que seja facilmente detectável. Alternativamente, uma sequência de ácido nucleico que codifica 7-epizingibereno pode ser introduzida por meio da cotransformação com um gene que codifica um marcador selecionável ou realçável, ou os dois genes podem estar presentes em um único T-DNA.

Toda ou parte de uma sequência de ácido nucleico da 7-epizingibereno sintase, que codificam uma proteína da 7-epizingibereno sintase (ou variante ou fragmento), também pode ser usada para transformar

micro-organismos, tais como bactérias (por exemplo, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, etc.), fungos, ou algas ou insetos, ou para fabricar vírus recombinantes. A transformação de bactérias, com toda ou
5 desta invenção, incorporado em um veículo de clonagem adequado, pode ser realizado em uma maneira convencional, preferivelmente usando técnicas de eletroporação convencionais como descrito em Maillon *et al.* (1989, FEMS Microbiol. Letters 60, 205-210.) e WO 90/06999. Para a expressão em célula hospedeira procariótica, o uso de códon da sequência de ácido nucleico pode
10 ser otimizada consequentemente (como descrito para as plantas acima). As sequências de intron devem ser removidas e outras adaptações para a expressão ótima podem ser feitas como conhecido.

 A sequência de DNA da sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase pode ser mudada ainda em uma maneira
15 traducionalmente neutra, para modificar possivelmente inibindo as sequências de DNA presentes na parte de gene e/ou pela introdução de mudanças para o uso do códon, por exemplo, adaptando o uso do códon para aquele mais preferido pelas plantas, preferivelmente o gênero de planta relevante específico, como descrito acima.

20 De acordo com uma forma de realização desta invenção, as proteínas da 7-epizingibereno sintase são alvejadas para as organelas intracelulares tais como plastídios, preferivelmente cloroplastos, mitocôndria, ou são secretados a partir da célula, potencialmente otimizando a estabilidade e/ou expressão da proteína. Similarmente, a proteína pode ser alvejada aos
25 vacúolos. O alvejamento aos plastídios é particularmente atraente visto que a produção excessiva de sesquiterpenos no citosol é usualmente tóxico para as células, ao passo que a produção excessiva de sesquiterpenos nos plastídios não sofre deste problema. Para este propósito, em uma forma de realização desta invenção, os genes quiméricos da invenção compreendem uma região

codificadora que codifica um peptídeo de sinal ou alvo, ligada à região codificadora da proteína da 7-epizingibereno sintase da invenção. O peptídeo de sinal ou alvo, por exemplo, pode ser o peptídeo que alveja o plastídio natural da dita 7-epizingibereno sintase, por exemplo, a sequência de aminoácido como representada na SEQ ID NO: 3 (codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 4). Outros peptídeos preferidos para serem incluídos nas proteínas desta invenção são os peptídeos de trânsito para cloroplasto ou outro alvejador plastídico, especialmente regiões de peptídeo de trânsito duplicadas a partir de genes de planta cujo produto de gene é alvejado aos plastídios, o peptídeo de trânsito otimizado de Capellades *et al.* (US 5.635.618), o peptídeo de trânsito da ferredoxina-NADP+oxidoreductase do espinafre (Oelmüller *et al.*, 1993, Mol. Gen. Genet. 237, 261-272), o peptídeo de trânsito descrito em Wong *et al.* (1992, Plant Molec. Biol. 20, 81-93) e os peptídeos alvejadores no pedido de patente PCT publicado WO 00/26371. Também preferido são peptídeos que sinalizam a secreção de uma proteína ligada a tal peptídeo fora da célula, tal como o sinal de secreção do inibidor II da proteinase da batata (Keil *et al.*, 1986, Nucl. Acids Res. 14, 5641-5650), o sinal de secreção do gene da alfa-amilase 3 do arroz (Sutliff *et al.*, 1991, Plant Molec. Biol. 16, 579-591) e o sinal de secreção da proteína PR1 do tabaco (Cornelissen *et al.*, 1986, EMBO J. 5, 37-40). Os peptídeos de sinal particularmente úteis de acordo com a invenção incluem o peptídeo de trânsito de cloroplasto (por exemplo, Van Den Broeck *et al.*, 1985, Nature 313, 358), ou o peptídeo de trânsito de cloroplasto otimizado da US 5.510.471 e US 5.635.618 que causa o transporte da proteína para os cloroplastos, um peptídeo de sinal secretor ou um peptídeo que alveja a proteína para outros plastídios, mitocôndria, o ER, ou uma outra organela. As sequências de sinal para alvejar para as organelas intracelulares ou para a secreção fora da célula de planta ou para a parede da célula são encontrados em proteínas naturalmente alvejadas ou secretadas, preferivelmente aquelas descritas por

Klösigen *et al.* (1989, Mol. Gen. Genet. 217, 155-161), Klösigen e Weil (1991, Mol. Gen. Genet. 225, 297-304), Neuhaus & Rogers (1998, Plant Mol. Biol. 38, 127-144), Bih *et al.* (1999, J. Biol. Chem. 274, 22884-22894), Morris *et al.* (1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 255, 328-333), Hesse *et al.* (1989, EMBO J. 8, 2453-2461), Tavladoraki *et al.* (1998, FEBS Lett. 426, 62-66.), Terashima *et al.* (1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 516-523), Park *et al.* (1997, J. Biol. Chem. 272, 6876-6881), Shcherban *et al.* (1995, Proc. Natl. Acad. Sci USA 92, 9245-9249).

Para permitir a secreção das proteínas da 7-epizingibereno sintase para o lado de fora da célula hospedeira transformada, um peptídeo de sinal de secreção apropriado pode ser fundido à extremidade de terminal amino (extremidade de terminal N) da proteína da 7-epizingibereno sintase. Os peptídeos de sinal putativos podem ser detectados usando a análise com base em computador, usando programas tais como o programa Signal Peptide search (SignalP V3.0) (Von Heijne, Gunnar, 1986 e Nielsen *et al.*, 1996).

Em uma forma de realização, várias sequências de ácido nucleico que codificam a 7-epizingibereno sintase são coexpressadas em um único hospedeiro, preferivelmente sob controle de promotores diferentes. Alternativamente, várias proteínas das sequências de ácido nucleico que codificam a 7-epizingibereno sintase podem estar presentes em um único vetor de transformação ou ser cotransformadas ao mesmo tempo usando vetores separados e selecionando transformantes que compreendem ambos os genes quiméricos. Similarmente, um ou mais genes que codificam a 7-epizingibereno sintase podem ser expressados em uma única planta junto com outros genes quiméricos, por exemplo que codificam outras proteínas que realçam a resistência à praga de inseto, ou outros.

É entendido que as proteínas diferentes podem ser expressadas na mesma planta, ou cada uma pode ser expressada em uma única planta e depois combinadas na mesma planta pelo cruzamento das plantas únicas entre

si. Por exemplo, na produção de semente híbrida, cada planta precursora pode expressar uma única proteína. No cruzamento das plantas precursoras para produzir híbridos, ambas as proteínas são combinadas na planta híbrida.

Preferivelmente, para propósitos de seleção mas também para
5 opções de controle de erva daninha, as plantas transgênicas da invenção também são transformadas com um DNA que codifica uma proteína que confere resistência ao herbicida, tal como um herbicida de amplo espectro, por exemplo herbicidas com base em glufosinato amônio como ingrediente ativo (por exemplo, Liberty® ou BASTA; a resistência é conferida pelo gene
10 PAT ou barra; ver a EP 0 242 236 e EP 0 242 246) ou glifosato (por exemplo, RoundUp®; a resistência é conferida pelos genes EPSPS, ver por exemplo, a EP0 508 909 e EP 0 507 698). Usando genes de resistência a herbicida (ou outros genes que conferem um fenótipo desejado) como marcador selecionável tem-se ainda a vantagem de que a introdução de genes de
15 resistência a antibiótico pode ser evitada.

Alternativamente, outros genes marcadores selecionáveis podem ser usados, tais como genes de resistência a antibiótico. Visto que no geral não é aceito reter genes de resistência a antibióticos nas plantas hospedeiras transformadas, estes genes podem ser removidos mais uma vez a
20 seguir da seleção dos transformantes. Tecnologias diferentes existem para a remoção de transgenes. Um método para se obter a remoção é pelo flanqueamento do gene quimérico com sítios lox e, a seguir da seleção, cruzamento da planta transformada com uma planta que expressa a CRE recombinase (ver por exemplo, a EP506763B1). A recombinação específica
25 de sítio resulta na excisão do gene marcador. Um outro sistema de recombinação específica de sítio é o sistema FLP/FRT descrito na EP686191 e US5527695. Os sistemas de recombinação específicos de sítio tais como CRE/LOX e FLP/FRT também podem ser usados para propósitos de empilhamento de gene. Além disso, sistemas de excisão de um componente

foram descritos, ver por exemplo, a WO9737012 ou WO9500555).

A presente invenção abrange um método para preparar uma 7-epizingibereno sintase que compreende a etapa de cultivar uma célula hospedeira que compreende pelo menos uma molécula de ácido nucleico de acordo com a presente invenção sob condições que permitem a produção da dita 7-epizingibereno sintase.

Também, a presente invenção fornece um método para preparar a 7-epizingibereno e/ou R-curcumeno que compreende as etapas de: a) transformar uma célula hospedeira com uma molécula de ácido nucleico, gene quimérico ou vetor da presente invenção; b) cultivar a dita célula hospedeira sob condições que permitam a produção de 7-epizingibereno; c) opcionalmente, isolar o 7-epizingibereno produzido na etapa b); e d) opcionalmente, desidrogenar o 7-epizingibereno para produzir R-curcumeno. A pessoa habilitada será capaz de rotineiramente selecionar condições que permitam a produção de 7-epizingibereno. A célula hospedeira pode ter sido metabolicamente engendrada para produzir ou superproduzir Z,Z-farnesil-difosfato (zFPP), o substrato para a 7-epizingibereno sintase da presente invenção, para produzir a 7-epizingibereno. A pessoa habilitada é capaz de realizar a produção excessiva do substrato da 7-epizingibereno sintase da presente invenção para produzir o 7-epizingibereno. Similarmente, uma pessoa habilitada na técnica será capaz de isolar o 7-epizingibereno produzido usando métodos de rotina para a isolamento de voláteis.

Quando exposto ao ar, o 7-epizingibereno isolado pode espontaneamente converter para R-curcumeno. Isto foi anteriormente observado por Bleeker *et al.* (Phytochemistry. Jan de 2011; 72(1): 68-73). Além disso, os mesmos autores mostram que a conversão, por exemplo pela desidrogenação controlada de 7-epizingibereno resultou em R-curcumeno puro. A pessoa habilitada é capaz de selecionar condições que permitam a conversão de 7-epizingibereno em R-curcumeno.

zFPP, o substrato para a 7-epizingibereno sintase da presente invenção, pode ser produzido ou superproduzido por qualquer meio conhecido na técnica. Por exemplo, o mesmo pode ser produzido naturalmente na célula hospedeira de escolha. Alternativamente, uma
5 sequência de ácido nucleico que codifica uma Z,Z-farnesil difosfato sintase (daqui em diante também referida como “zFPS”) pode ser introduzida dentro de uma célula hospedeira para se obter a expressão de zFPP na dita célula hospedeira. Preferivelmente, tal célula hospedeira compreende uma fonte de difosfato de isopentenila (“IPP”) e difosfato de dimetilalila (“DMAPP”).

10 Uma proteína isolada ou recombinante tendo atividade de Z,Z-FPS (“zFPS”) derivada de *Solanum habrochaites* é descrita na WO 2008/142318 (aqui incorporada por referência) e pode ser encontrada ainda no acesso do Banco de Gene no. ACJ38408.1. Como usado no contexto da presente invenção, o termo “Z,Z-farnesil difosfato sintase” ou “zFPS” indica
15 uma proteína tendo uma sequência de aminoácido como representada na SEQ ID NO: 6 ou uma variante da mesma tendo pelo menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, ou 99 % de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 6, preferivelmente no tamanho natural.

20 A presente invenção portanto também refere-se a um método para produzir 7-epizingibereno a partir de zFPP em uma célula hospedeira, que compreende:

a) introduzir dentro da dita célula hospedeira uma primeira sequência de ácido nucleico que codifica um zFPS como aqui descrito e uma
25 segunda sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase da presente invenção;

b) cultivar a célula transformada em condições adequadas para a expressão da dita primeira e da dita segunda sequências de ácido nucleico; e,

c) opcionalmente, coletar o zFPP e/ou o 7-epizingibereno

contido na dita célula e/ou no meio de cultura.

A primeira sequência de ácido nucleico e a segunda sequência de ácido nucleico podem estar presentes em um único vetor ou podem estar presentes em vetores separados.

5 Células de planta/plantas/sementes transformadas e usos da sequência de ácido nucleico e proteínas de acordo com a invenção

Na parte que segue o uso das sequências de ácido nucleico que codificam a 7-epizingibereno sintase de acordo com a invenção para gerar células de planta, plantas, sementes de planta, transgênicas etc. e qualquer
10 derivado/progênie das mesmas, com um fenótipo da resistência aumentada à praga de inseto é descrito.

Uma planta transgênica com resistência aumentada à praga de inseto pode ser gerada pela transformação de uma célula de planta hospedeira com uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos uma proteína da 7-
15 epizingibereno sintase sob o controle de um promotor adequado, como descrito acima, e regenerar uma planta transgênica a partir da dita célula.

Os promotores preferidos são promotores que são indutíveis pela praga de inseto, como descrito acima.

Preferivelmente, as plantas transgênicas da invenção
20 compreendem resistência aumentada à praga de inseto contra uma ou mais pragas de inseto, especialmente. Assim, por exemplo as plantas de tomate ou batata transgênicas compreendem resistência aumentada a pelo menos um, ou mais, das espécies de inseto listadas acima.

“Resistência à praga de inseto” ou “resistência
25 aumentada/realçada à praga de inseto” é aqui usado para se referir a uma capacidade realçada das plantas que abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção (comparadas com as plantas do tipo selvagem ou de controle que não abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção) para suportar o ataque de uma ou mais pragas de inseto de planta, ou em

outras palavras, refere-se a uma redução significativa nos sintomas de doença em plantas que abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção comparada com as plantas de controle que não abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção (ou transformados com vetor vazio). A

5 resistência à praga de inseto ou resistência aumentada à praga de inseto pode ser determinada usando uma variedade de métodos. Frequentemente os sintomas de doença são contados visualmente (nos bioensaios ou no campo) pela avaliação dos sintomas de doença em um ou mais pontos de tempo depois da infestação ou contato com uma praga de inseto. Os métodos

10 alternativos incluem métodos por meio dos quais a praga de inseto é detectada e opcionalmente quantificada. Uma planta (transgênica) pode assim mostrar resistência aumentada à praga de inseto se a quantidade ou número de pragas de inseto detectados em/no tecido for significativamente menor comparado aos controles, ou se a praga de inseto disseminada for significativamente menor do

15 que nos controles. Por fim, um aumento significativo no rendimento médio de plantas que abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção (por exemplo, pelo menos 1 %, 2 %, 5 %, 10 % ou mais) comparado aos controles, quando cultivados sob pressão de praga de inseto equivalente (preferivelmente no campo) fornece uma medida indireta da resistência

20 aumentada à praga de inseto.

Assim, uma pluralidade de plantas que abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção, por exemplo, plantas transgênicas, que expressam a proteína da 7-epizingibereno sintase da invenção mostram

25 resistência aumentada à praga de inseto se elas mostram uma redução significativa de sintomas de doença, comparado com as plantas que não abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção. Obviamente, a análise estatística é requerida para determinar se diferença significativa existe. Preferivelmente, um ou mais sintomas de doença são em média de pelo menos 2 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, ou mesmo 100 %

mais baixos nas que plantas que abrigam a sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase do que nas plantas de controle. Visto que o ensaio de doença é diferente para cada combinação de hospedeiro-praga de inseto, nenhum protocolo específico pode ser fornecido, mas a pessoa

5 habilitada sabe como determinar se as plantas que abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção mostram resistência à doença significativamente realçada a uma ou mais pragas de inseto. Bioensaios como conhecidos na técnica para cada combinação de planta-praga podem ser usados para comparar a resistência de plantas transgênicas com os controles

10 adequados.

No geral, o papel do 7-epizingibereno produzido pela proteína codificada pela sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 na resistência (toxidez e/ou repelência) às pragas de inseto será determinado através do uso de experimentos de escolha e não escolha. Em particular, um teste de escolha será

15 realizado. Em um teste de escolha estágios de vida diferentes (por exemplo, larvas ou adultos) serão permitidos escolher entre plantas (transgênicas) que produzem 7-epizingibereno (através da expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1) e plantas não transgênicas (ou vetor vazio). Este teste determinará a atividade repelente do 7-epizingibereno

20 produzido pela proteína da SEQ ID NO: 1.

Um teste que não de escolha também será realizado para determinar os efeitos tóxicos do 7-epizingibereno produzido através da expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1. Nestes experimentos, espécies de praga de

25 inseto são forçadas a comer de plantas (transgênicas) que produzem 7-epizingibereno (através da expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1) e plantas não transgênicas (ou vetor vazio). Subsequentemente, o desempenho do inseto (por exemplo, crescimento, desenvolvimento ou adaptação) será determinado

como uma medida da toxidez.

Também é uma forma de realização gerar plantas transgênicas que expressem várias proteínas da 7-epizingibereno sintase, preferivelmente sob o controle de promotores diferentes, tais como promotores indutíveis por pragas diferentes.

O fenótipo de resistência à doença pode ser sintonizado fino pela expressão de uma quantidade adequada de proteína da 7-epizingibereno sintase em um tempo e local adequados. Tal sintonia fina pode ser feita pela determinação do promotor mais apropriado para uma combinação de hospedeiro-praga particulares e também pelos “eventos” transgênicos selecionados que mostram o nível de expressão desejado. Um nível muito baixo de proteína da 7-epizingibereno sintase ou indução muito lenta da produção de proteína da 7-epizingibereno sintase que seguem o ataque da praga de inseto podem ser insuficientes para realçar os níveis de resistência à doença. Por outro lado, um nível ou expressão de proteína muito alto em tempos e locais destituídos de ataque de praga de inseto, podem resultar em fenótipos e penalidades de rendimento agronomicamente indesejados. Entretanto, a pessoa habilitada pode facilmente gerar plantas tendo resistência à doença aumentada, mas que ao mesmo tempo sejam agronomicamente aceitáveis.

As plantas que abrigam a sequência de nucleotídeo da presente invenção que expressam os níveis desejados da proteína da 7-epizingibereno sintase são selecionadas por exemplo, pela análise do número de cópia (análise de Southern blot), os níveis de transcrito de mRNA, pela análise da presença e nível de proteína da 7-epizingibereno sintase em vários tecidos (por exemplo, SDS-PAGE; ensaios de ELISA, etc), ou pela determinação da quantidade de 7-epizingibereno, usando métodos analíticos tais como GC-MS. Por razões regulatórias, preferivelmente transformantes de cópia única são selecionados e as sequências que flanqueiam o sítio de inserção do gene

quimérico é analisado, preferivelmente sequenciado para caracterizar o “evento”. Eventos transgênicos que expressam a sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase altos ou moderados são selecionados para cruzamento/retrocruzamento/autopolinização adicionais até que um evento de elite de alto desempenho com um transgene estável da sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase é obtido.

Os transformantes que expressam um ou mais genes da 7-epizingibereno sintase de acordo com a invenção também podem compreender outros transgenes, tais como outros genes que conferem resistência à doença ou que conferem tolerância a outros estresses bióticos e/ou abióticos. Para obter tais plantas com transgenes “empilhados”, outros transgenes podem ser introgrididos dentro dos transformantes da sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase, ou os transformantes da sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase podem ser transformados subsequentemente com um ou mais outros genes, ou alternativamente vários genes quiméricos podem ser usados para transformar uma linhagem ou variedade de planta. Por exemplo, vários genes quiméricos podem estar presentes em um único vetor, ou podem estar presentes em vetores diferentes que são cotransformados.

Em uma forma de realização os genes que seguem são combinados com um ou mais genes da 7-epizingibereno sintase de acordo com a invenção: os genes de resistência à doença conhecidos, especialmente genes que conferem resistência aumentada aos patógenos, genes de resistência a vírus, genes de resistência ao estresse abiótico (por exemplo, tolerância à seca, tolerância ao sal, tolerância ao calor ou frio, etc.), genes de resistência a herbicida, e os semelhantes. Os transformantes empilhados podem assim ter uma tolerância ao estresse biótico e/ou abiótico ainda mais ampla, para resistência a patógeno, resistência a nematóide, salinidade, estresse de frio, estresse de calor, estresse de água, etc. Também, os métodos que silenciam a

sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase podem ser combinados com os métodos de expressão da sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase em uma única planta. Por exemplo, a superexpressão da sequência de ácido nucleico que codifica a 7-epizingibereno sintase em raízes ou tubérculos pode conferir ou realçar a resistência da raiz ou tubérculo às pragas do solo.

Também é possível introduzir ou introgridir o gene da 7-epizingibereno sintase dentro de uma linhagem de cruzamento de planta que já tenha um certo nível de resistência à praga de inseto. Para a durabilidade da resistência à praga de inseto no campo, pode ser desejável empilhar vários mecanismos de resistência à doença em uma planta, preferivelmente por meio dos quais as fontes de resistência têm mecanismos moleculares subjacentes diferentes.

Plantas inteiras, sementes, células, tecidos e progênie (tais como híbridos F1, sementes/plantas F2, etc.) de qualquer uma das plantas transformadas descritas acima são abrangidas aqui e podem ser identificadas pela presença do transgene no DNA, por exemplo pela análise de PCR usando DNA genômico total como padrão e usando os pares de iniciadores de PCR específicos da sequência de ácido nucleico que codifica a zingibereno sintase. Também métodos de diagnóstico de PCR de “específicos de evento” podem ser desenvolvidos, onde os iniciadores de PCR são fundamentados no DNA da planta que flanqueia o gene quimérico inserido, ver a US6563026. Similarmente, impressões digitais de AFLP ou impressões digitais de RFLP de específicos de evento podem ser desenvolvidas que identificam a planta transgênica ou qualquer planta, semente, tecido ou células derivado da mesma.

É entendido que as plantas transgênicas de acordo com a invenção preferivelmente não mostram fenótipos não desejados, tais como redução de rendimento, suscetibilidade realçada às doenças ou mudanças de arquitetura indesejadas (nanismo, deformações) etc. e que, se tais fenótipos são observados nos transformantes primários, estes podem ser removidos

pelos métodos normais de procriação e seleção (cruzamento/retrocruzamento/autopolinização, etc.). Qualquer uma das plantas transgênicas aqui descritas pode ser homozigota ou hemizigota para o transgene.

- 5 A presente invenção também refere-se a uma planta, célula de planta, semente ou fruta de *Solanum lycopersicum* ou *Lycopersicon esculentum*, que compreendem uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 ou uma sequência de aminoácido que compreendem pelo menos 92 % de identidade de sequência de
- 10 aminoácido com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 1 em relação ao comprimento inteiro. A *Solanum lycopersicum* do tipo selvagem não produz quantidades detectáveis de 7-epizingibereno. Usando a sequência de nucleotídeo da presente invenção, é possível preparar uma planta, célula de planta, semente ou fruta de *Solanum lycopersicum* transgênicas ou não
- 15 transgênicas tendo resistência à praga de inseto realçada. Preferivelmente, a dita planta, célula de planta, semente ou fruta de *Solanum lycopersicum* compreendem ainda uma sequência de ácido nucleico que codifica uma Z,Z-farnesil difosfato sintase.

Sequências referidas

- 20 SEQ ID NO 1: sequência de aminoácido da proteína da zingibereno sintase plastídica de *Solanum habrochaites*.

CSHSTPSSMNGFEDARDRIRESFGKVELSPSSYDTAWVAMVPSKHSLN
EPCFPQCLDWIENQREDGSWGLNPSHPLLLKDSLSTLACLLALTKW
RVGDEQIKRGLGFIETQSWAIDNKDQISPLGFEIIFPSMIKSAEKLNLNL
25 AINKRDSTIKRALQNEFTRNIEYMSEGFGELCDWKEIIKLHQRQNGSLF
DSPATTAALIIYHQHDKKCYEILNSILQQHKNWVPTMYPTKIHSLCL
VDTLQNLGVHRHFKSEIKKALDEIYRLWQQKNEEIFSNVTHCAMAFR
LLRISYYDVSSDELAEFVDEEHFFATSGKYTSHVEILELHKASQLAIDH
EKDDILDKINNWTRTFMEQKLLNNGFIDRMSKKEVELALRNFYIISDL

AENRRYIKSYEENNFKILKAAYRSPNINNKDLFIFSIRDFELCQAQHQE
 ELQQLKRWFEDCRLDQLGLSEQFISASILCAPIVPGPELSDARLVYAK
 YVMLLTIVDDHFESFASTDECLNIIELVERWDDYASVGYKSERVKVL
 SMFYKSIEEIATIAEIKQGRSVKNHLINLWLKVMKLMLMERVIEWCSG
 5 KTIPRIEEILYVSSITFGSRLIPLTTQYFIGIKISKDLLESDEIYGLCNFTGI
 VLRLNLDLQDSKREQKEGSINLVTLLMKSISEEEAIMKMKEILEMKRR
 ELFKMVLVQKKGSQLPQLCKEIFWRTCKWAHFTYSQTDYRFPEEM
 ENHIDEVIFYKPLNH

SEQ ID NO 2: sequência de ácido nucleico do gene da zingibereno sintase de
 10 *Solanum habrochaites* (apenas a sequência codificadora).

TGCAGCCACAGTACCCCTTCATCAATGAATGGTTTCGAAGATGCAA
 GGGATAGAATAAGGGAAAGTTTTGGGAAAGTAGAGTTATCTCCTT
 CTTCTATGACACAGCATGGGTAGCTATGGTCCCTTCAAAACATTC
 ACTAAATGAGCCATGTTTTCCACAATGTTTGGATTGGATTATTGAA
 15 AATCAAAGAGAAGATGGATCTTGGGGACTAAACCCTAGCCATCCA
 TTGCTTCTTAAGGACTCACTTTCTTCCACTCTTGCATGTTTGCTTGC
 ACTAACCAAATGGAGAGTTGGAGATGAGCAAATCAAAAGAGGCCT
 TGGCTTTATTGAAACCCAGAGTTGGGCAATTGATAACAAGGATCA
 AATTTACCTCTAGGATTTGAAATTATATTTCCCAGTATGATCAAG
 20 TCTGCAGAAAACTAAACTTAAATCTAGCAATTAACAAAAGAGAT
 TCAACAATTAAAAGAGCATTACAGAATGAGTTCACGAGGAATATT
 GAATATATGAGTGAAGGATTTGGTGAATTATGTGATTGGAAGGAA
 ATAATAAAGTTACATCAAAGGCAAAATGGTTCATTATTTGATTAC
 CAGCCACTACTGCAGCTGCCTTGATTTACCATCAGCATGATAAAAA
 25 ATGCTATGAATATCTTAATTCAATCTTGCAACAACACAAAAATTGG
 GTTCCCCTATGTATCCAACAAAGATACATTCATTGCTTTGCTTGG
 TTGATACACTTCAAAATCTTGGAGTACATCGGCATTTTAAATCAGA
 AATAAAGAAAGCCCTAGATGAAATATACAGGCTATGGCAACAAAA
 GAATGAAGAAATTTTCTCAAATGTCACCCATTGTGCTATGGCTTTT

CGACTTCTAAGGATAAGCTACTATGATGTCTCCTCAGATGAACTAG
CAGAATTTGTGGATGAAGAACATTTCTTTGCAACAAGTGGGAAAT
ATACAAGTCATGTTGAAATTCTTGAAGCTCCACAAAGCATCACAATT
GGCTATTGATCATGAGAAAGATGACATTTTGGATAAGATTAACAA
5 TTGGACAAGAACATTTATGGAGCAAAAACCTCTTAAACAATGGCTT
CATAGATAGGATGTCAAAAAAGGAGGTGGAAGTTGCTTTGAGGAA
TTTTTATATCATATCTGATCTAGCAGAAAATAGAAGATATATAAAG
TCATACGAAGAGAACAATTTTAAAATCTTAAAAGCAGCTTATAGG
TCACCTAACATTAACAATAAGGACTTGTTTATATTTTCAATACGCG
10 ACTTTGAATTATGCCAAGCTCAACACCAAGAAGAACTTCAACAAC
TCAAGAGGTGGTTTGAAGATTGTAGATTGGACCAACTCGGACTTTC
GGAACAATTTATATCTGCTAGTTACTTATGTGCTATTCCTATTGTCC
CCGGGCCTGAATTATCCGATGCTCGTCTCGTGTACGCGAAATACGT
CATGCTCTTGACTATTGTGCGATGATCATTTTCGAGAGTTTTGCATCTA
15 CAGATGAATGTCTCAACATCATTGAATTAGTAGAAAGGTGGGATG
ACTATGCAAGTGTAGGTTATAAATCTGAGAGGGTTAAAGTTTTATT
TTCAATGTTTTACAAATCAATAGAGGAGATTGCAACAATTGCTGAA
ATTAAACAAGGACGATCTGTCAAAAATCACCTTATTAATTTGTGGC
TTAAAGTGATGAAGTTGATGTTGATGGAACGAGTAGAGTGGTGTT
20 CTGGCAAGACAATACCAAGAATAGAAGAGTATTTGTATGTTAGTT
CTATAACATTTGGTTCAAGATTGATTCCTCTCACAAACACAATATTT
TATTGGAATAAAAATATCCAAAGATCTTTTAGAAAGTGATGAAATT
TATGGTTTATGCAATTTTACCGGTATAGTCTTGAGGCTCCTCAATG
ATTTACAAGATTCCAAGAGAGAACAAAAGGAGGGCTCAATAAATT
25 TAGTCACATTACTAATGAAAAGTATCTCTGAGGAAGAAGCTATAA
TGAAGATGAAGGAAATCTTGGAAATGAAAAGAAGAGAGTTATTTA
AAATGGTTTTAGTTCAAAAAAAGGGAAGCCAATTGCCTCAATTAT
GCAAAGAAATATTTTGGAGGACATGCAAATGGGCTCATTTCACTT
ATTCACAAACTGATAGATATAGATTTCCAGAGGAAATGGAGAATC

ACATTGATGAAGTCTTTTACAAACCACTCAATCATTA

SEQ ID NO: 3. Sequência de aminoácido da sequência que alveja o plastídio da zingibereno sintase da invenção

MIVGYRSTIITLSHPKLGNGKTISSNAIFRRSCRVR

5 SEQ ID NO: 4. Sequência de ácido nucleico da sequência que alveja plastídio da zingibereno sintase da invenção

ATGATAGTTGGCTATAGAAGCACAAATCATAACCCTTTCTCATCCTA
AGCTAGGCAATGGGAAAACAATTTTCATCCAATGCAATTTTCCGGA
GATCATGTAGAGTAAGA

10 SEQ ID NO: 5. Sequência de ácido nucleico de zFPS da *S. habrochaites* PI127826

GCTCGTGGACTCAACAAGATTTTCATGCTCACTCAGCTTACAAACCG
AAAAACTTTGTTATGAGGATAATGATAATGATCTTGATGAAGAACT
TATGCCTAAACACATTGCTTTGATAATGGATGGTAATAGGAGATGG
15 GCAAAGGATAAGGGTTTAGACGTATCCGAAGGTCACAAACATCTC
TTTCCAAAATTAAAAGAGATTTGTGACATTTCTTCTAAATTGGGAA
TACAAGTTATCACTGCTTTTGCATTCTCTACTGAAAATTGGAAACG
AGCCAAGGGGGAGGTTGATTTCTTGATGCAAATGTTCTGAAGAAGT
CTATGATGAGTTTTTCGAGGTCTGGAGTAAGAGTGTCTATTATTGGT
20 TGTA AAAACCGACCTCCCAATGACATTACAAAAATGCATAGCATT
ACAGAAGAGACTACAAAGGGAAACAAAGGACTTCACCTTGTGATT
GCACTAAACTATGGTGGATATTATGACATATTGCAAGCAACAAAA
AGCATTGTTAATAAAGCAATGAATGGTTTATTAGATGTAGAAAAT
ATCAACAAGAATTTATTTGATCAAGAACTTGAAAGCAAGTGTCCA
25 AATCCTGATTTACTTATAAGGACAGGAGGTGTTCAAAGAGTTAGTA
ACTTTTTGTTGTGGCAATTGGCTTATACTGAATTTTACTTCACCAAA
ACATTGTTTCCTGATTTTGGAGAGGAAGATCTTAAAGAGGCAATAA
TAAACTTTCAACAAAGGCATAGACGTTTTTGGTGGACACACATATTG
A

SEQ ID NO: 6. Sequência de aminoácido de zFPS da *S. habrochaites* PI127826

ARGLNKISCSLSLQTEKLCYEDNDNDLDEELMPKHIALIMDGNRRWA
 KDKGLDVSEGHKHLFPKLKEICDISSKLGIVITAFSTENWKRAKG
 5 EVDFLMQMFEELYDEFSGVRVSIIGCKTDLPMTLQKCIALTEETTK
 GNKGLHLFRASCONYGGYYDILQATKSIVNKAMNGLLDVENINKNLF
 DQELESKCPNPDLLIRTGGVQRVSNFLLWQLAYTEFYFTKTLFPDFGE
 EDLKEAIINFQQRHRRFGGHTY

SEQ ID NO: 7. Peptídeo de sinal de zFPS da *S. habrochaites* PI127826

10 MSSLVLQCWKLSSPSLILQQNTSISMGAFAFKGIHKLQIPNS
 PLTVS

SEQ ID NO: 8 Sequência de ácido nucleico do peptídeo de sinal de zFPS da *S. habrochaites* PI127826

ATGAGTTCTTTGGTTCTTCAATGTTGGAAATTATCATCTCCATCTCT
 15 GATTTTACAACAAAATACATCAATATCCATGGGTGCATTCAAAGGT
 ATTCATAAACTTCAAATCCCAAATTCACCTCTGACAGTGTCT

Figuras

A Figura 1 mostra os resultados pela Espectrometria de Massa com Cromatografia Gasosa (GCMS) da produção de 7-epizingibereno usando
 20 zFPP como precursor pela *E. coli* transformada com a sequência de nucleotídeo que codifica a 7-epizingibereno sintase. O 7-epizingibereno foi identificado pela sua impressão digital de massa de íon MS, tempo de retenção e índice Kovats.

A Figura 2 mostra espectros de massa de 7-epizingibereno produzido pela expressão da sequência de nucleotídeo que codifica a 7-
 25 epizingibereno sintase (Figura 2A) na *E. coli* e 7-epizingibereno produzido pelos tricomas PI127826 de *S. habrochaites* (Figura 2B).

A Figura 3A mostra a determinação do enantiômero de ShZIS

A cromatografia gasosa enantiosseletiva na coluna revestida

com ciclodextrina permitiu a identificação dos estereoisômeros de zingibereno diferentes (coluna Astec CHIRALDEX[®] B-DM, Supelco). Do topo para o fundo:

S. habrochaites = controle positivo para 7-epizingibereno;

5 F2 ShxSI = a F2 produz 7-epizingibereno com zFPP como precursor

gingeroil = controle positivo para o alfa-zingibereno.

ShZIS + óleo de gengibre = ShZIS com zFPP produz 7-epizingibereno e o óleo de gengibre contém alfa-zingibereno

10 A figura indica que ShZIS sintetiza 7-epizingibereno quando fornecido com zFPP. Além disso, a mesma mostra evidência de que as plantas F2 usadas nos bioensaios também produzem 7-epizingibereno.

A Figura 3B mostra a determinação do enantiômero do zingibereno produzido pelo ShZIS.

15 A cromatografia gasosa enantiosseletiva na coluna revestida com ciclodextrina permitiu a identificação dos estereoisômeros de zingibereno diferentes (coluna Astec CHIRALDEX[®] B-DM, Supelco). Do topo para o fundo:

S. habrochaites = controle positivo para a 7-epizingibereno;

20 α ZIS +FPP = alfa-zingibereno sintase fornecida com FPP produz α -zingibereno;

α ZIS +FPP & ShZIS + zFPP = alfa-zingibereno sintase fornecida com FPP produz alfa-zingibereno e ShZIS sintetiza 7-epizingibereno quando fornecido com zFPP.

25 Óleo de gengibre = controle positivo para a alfa-zingibereno.

ShZIS+ zFPP= a proteína ShZIS, quando fornecida com zFPP como um precursor produz 7-epizingibereno.

A figura indica que ShZIS sintetiza 7-epizingibereno quando fornecido com zFPP. A zingibereno sintase de manjeriço (ObZIS; Iijima *et*

al., 2004) é uma alfa-zingibereno sintase legítima quando fornecida com FPP.

A Figura 4 mostra a produção de 7-epizingibereno em plantas de *S. lycopersicum* transgênicas, quando tanto zFPS quanto ShZIS são expressados sob promotores específicos de tricoma. A. A produção de 7-epizingibereno como medido pela GCMS. São representados os perfis de terpenóide de plantas de controle não transformadas (*S. lyc*), as plantas de *S. lycopersicum* transformadas apenas com zFPS, e as plantas *S. lycopersicum* transformadas tanto com zFPS quanto com ShZIS sob promotores específicos de tricoma. O 7-epizingibereno foi produzido apenas em plantas transformadas com zFPS e ShZIS (ambos sob promotores específicos de tricoma). B. A cromatografia gasosa enantiosseletiva na coluna revestida com ciclodextrina mostrou que a produção de zingibereno em plantas de *S. lycopersicum* transformadas com zFPS e ShZIS (*S. lycopersicum* zFPS-ZIS na figura), como na *S. Habrochaites* selvagem, é 7-epizingibereno.

A Figura 5 mostra a concentração de zingibereno (ng de terpenos por mg de folha FW) em três genótipos diferentes. Um cruzamento interespécies entre *S. lycopersicum* e *S. habrochaites* foi realizado e as linhagens F2 foram testadas para a produção de zingibereno. Os cortes foram feitos de linhagens F2 que produzem zingibereno, *S. lycopersicum* C32 (Moneymaker) e de *S. habrochaites* (PI127826). As plantas F2 e *S. habrochaites* (PI127826) mostraram quantidades similares de 7-epizingibereno, nenhum 7-epizingibereno foi detectável em *S. lycopersicum* C32.

A Figura 6A mostra a porcentagem de adultos de *B. tabaci* mortos (mortalidade) em três genótipos diferentes.

Experimentos de prender com grampo foram realizados nos cortes de linhagens F2, *S. lycopersicum* C32 (Moneymaker) e de *S. habrochaites* (PI127826). Comparado com *S. habrochaites* e plantas F2, a porcentagem de adultos mortos depois de 5 dias foi significativamente mais baixa na *S. lycopersicum* (Figura 4a; ANOVA de uma via, LSD; $p < 0,05$ para

ambas as comparações).

A Figura 6B mostra o número total de ovos depositados pelos adultos da mosca branca em cinco dias.

Experimentos de prender com grampo foram realizados nos cortes de linhagens F2, *S. lycopersicum* C32 e de *S. habrochaites* (PI127826). O número de ovos depositados pelos adultos de *B. tabaci* fêmeas foi significativamente mais alto na *S. lycopersicum* C32 comparado com as plantas F2 ou *S. habrochaites* (Fig 4b; ANOVA de uma via, LSD; $p < 0,05$ para ambas as comparações).

A Figura 7A mostra os níveis de 7-epizingibereno de plantas F2 expressado como [zingibereno] (ng mg⁻¹ FW folha).

A Figura 7B mostra a sobrevivência de larvas recém nascidas do besouro da batata do Colorado (CPB) em um bioensaio (24 horas de alimentação).

A Figura 7C mostra o dano da alimentação pelo CPB - 24 horas de alimentação.

A Figura 7D mostra o dano da alimentação pelo CPB - 24 horas de alimentação – o dano é classificado como unidades arbitrárias (pixels).

A Figura 8 demonstra a preferência da mosca branca da estufa (*Trialeurodes vaporariora*) em um ensaio de escolha para plantas que produzem baixo 7-epizingibereno (linhagem F2-45) em relação às plantas de 7-epizingibereno alto (linhagem F2-40).

A Figura 9 mostra o desempenho do afídio da batata/tomate (*Macrosiphum euphorbiae*) em um ensaio de escolha entre plantas que produzem baixo 7-epizingibereno (linhagem F2-45) e plantas que produzem 7-epizingibereno alto (linhagem F2-40).

A Figura 10A demonstra a oviposição de *Tuta absoluta*. As traças de *Tuta absoluta* foram liberadas em uma gaiola sobre plantas F2 que produziram uma faixa de 7-epizingibereno. Estas plantas surgiram de um cruzamento

interespecie entre *S. lycopersicum* (C32) e *S. habrochaites* (PI127826). O número de ovos por genótipo de tomate foi determinado depois de 5 dias.

A Figura 10B mostra que a produção de 7-epizingibereno nestas plantas F2 surge de um cruzamento interespecie entre *S. lycopersicum* (C32) e *S. habrochaites* (PI127826).

A Figura 11A demonstra a fecundidade do ácaro aranha (*T. urticae*) na *S. lycopersicum* (C32), *S. lycopersicum* transgênica que produz 7-epizingibereno (linhagem 2) e *S. habrochaites* (PI127826).

A Figura 11B mostra a sobrevivência do ácaro aranha (*T. urticae*) na *S. lycopersicum* (C32), *S. lycopersicum* transgênica que produz 7-epizingibereno (linhagem 2) e *S. habrochaites* (PI127826).

A Fig. 11C demonstra a fecundidade do ácaro aranha (*T. evansi*) no *S. lycopersicum* (C32), *S. lycopersicum* transgênica que produz 7-epizingibereno (linhagem 2) e *S. habrochaites* (PI127826).

A Figura 11D demonstra a sobrevivência do ácaro aranha (*T. evansi*) na *S. lycopersicum* (C32), *S. lycopersicum* transgênica que produz 7-epizingibereno (linhagem 2) e *S. habrochaites* (PI127826).

Os Exemplos não limitantes que seguem ilustram as formas de realização diferentes da invenção. A menos que de outro modo estabelecido nos exemplos, todas as técnicas de DNA recombinante são realizadas de acordo com protocolos padrão como descrito em Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, e Sambrook e Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Terceira Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; e nos Volumes 1 e 2 de Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols*, USA. Os materiais e métodos padrão para o trabalho molecular de planta são descritos em *Plant Molecular Biology Labfax* (1993) por R. D. D. Croy, conjuntamente publicado pela BIOS Scientific Publication Ltd (UK) e Blackwell Scientific Publications, UK.

Todas as referências citadas na presente descrição são aqui incorporadas por referência.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Ensaio de Expressão da *E. coli* para determinar a produção de 7-epizingibereno

O gene de tamanho natural (que compreende a SEQ ID NO: 4 5' da SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 2)) foi clonado dentro do vetor de expressão de pGEX-KG (Guan e Dixon 1991). As construções foram transformadas para células de *E. coli* C41 (DE3) (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004). Como um controle, o vetor pGEX-KG vazio foi transformado. Uma cultura foi cultivada a uma OD₆₀₀ de 0,5- 0,6 a 37°C e colocada a 4°C por 30 min. A expressão de proteína foi induzida com 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Depois de 16 horas de incubação a 16°C, as células foram colhidas pela centrifugação. O sobrenadante foi removido e a pelota foi recolocada em suspensão em tampão de ensaio (25 mM de HEPES, pH 7,2, 10 mM de MgCl₂, 10 % (v/v) de glicerol) com lisozima adicionada (1 mg mL⁻¹) e inibidores de proteinase e incubadas em gelo por 30 minutos e subsequentemente sonificadas. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante foi armazenado a -80°C. Os ensaios de atividade foram realizados em 500 μL de HEPES a 50 mM, pH 7,2, 100 mM de KCl, 7,5 mM de MgCl₂, 20 μM de MgCl₂, 5 % (v/v) de glicerol, 5 mM de DTT com 50 μL de proteína e 2 mM de cis-FPP (difosfato de 2Z-6Z-farnesila) como substrato. Os produtos de enzima foram analisados pela GC-MS com fibra de Micro Extração de Fase Sólida (SPME). Os produtos de terpeno foram identificados usando padrões e comparando os espectros de íon, tempo de retenção e Índice de Kovats (ver as Figuras 1 e 2).

Exemplo 2: Determinação do enantiômero of zingibereno produzido pelos vários genes/proteínas.

Os ensaios de atividade foram realizados em frascos de vidro de 20 mL em um volume total de 500 μL de HEPES a 50 mM, pH 7,2, 100

mM de KCl, 7,5 mM de MgCl₂, 20 µM de MgCl₂, 5 % (v/v) glicerol, 5 mM de DTT com 50 µL de proteína e 2 mM de cis-FPP (difosfato de 2Z-6Z-farnesila), trans-FPP (difosfato de *E-E*-farnesila), GPP (difosfato de geranila), NDP (difosfato de nerila), ou GGPP (difosfato de geranilgeranila) como um substrato (Echelon Biosciences Incorporated, Salt Lake City, USA). Os frascos foram fechados com uma tampa plissada revestida com teflon imediatamente e incubada sob agitação moderada por 1 hora a 30°C.

Os produtos de enzima foram amostrados com uma fibra de Micro Extração de Fase Sólida (SPME) por 10 minutos depois que o frasco foi agitado e aquecido a 50° C. A fibra foi dessorvida por 1 minuto em um orifício injetor óptico (ATAS GL Int. Zoeterwoude, NL) que foi mantido a 220°C. Para a injeção de líquido 1 a 3 µL de amostra em hexano foram injetados.

De modo a separar alfa-zingibereno de 7-epizingibereno a coluna Astec CHIRALDEXTM B-DM (30 m x 0,25 mm x 0,12 µm de espessura de película; Supelco) foi selecionada. A coluna foi colocada em um cromatógrafo a gás 6890 N (Agilent, Amstelveen, NL). O programa foi inicialmente ajustado a 115°C por 3 minutos, aumentado para 140°C por 4°C min⁻¹ onde o mesmo foi mantido por um minuto mais depois do que a temperatura lentamente aumentou (2°C min⁻¹) até 166°C quando foi mantida 5 minutos antes de um aumento rápido com 40°C min⁻¹ até 220°C. Hélio foi usado como um gás carregador. Os espectros de massa foram gerados com a fonte de íon ajustado a -70V a 200°C e coletada com um Tempo-de-Voo MS (Leco, Pegasus III, St. Joseph, MI, USA) a 1850 V, com uma taxa de aquisição de 20 varreduras por segundo.

Tempo de condução 1800 s; Temperatura de injetor inicial: 220°C; Temperatura de injetor final: 220°C; Fluxo de transferência de coluna: 1,5 mL min⁻¹; Tempo de transferência: 120 s; Fluxo de coluna inicial: 1 mL min⁻¹; Fluxo de coluna final: 1 mL min⁻¹; Fluxo de divisão: 25 mL min⁻¹

Mais especificações sobre colunas podem ser obtidas por intermédio do fornecedor ou por intermédio de: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&N4=66023AST|SUPELCO&N25=0&QS=ON&F=SPEC

Resultados

A cromatografia gasosa enantiosseletiva na coluna revestida com ciclodextrina permitiu a identificação dos estereoisômeros de zingibereno diferentes em *S. habrochaites* e gengibre, anteriormente inseparáveis pela nossa análise de GC-MS. Pela RMN foi determinado que *S. habrochaites* PI127826 produz 7-epizingibereno, ao passo que gingeroil contém alfa-zingibereno (Bleeker *et al.*, 2011). Os extratos de *S. habrochaites* e gingeroil foram usados como controles positivos para estudar a situação de enantiômero de zingiberenos sintetizados pela ObZIS (zingibereno sintase do manjerição doce; Iijima *et al.*, 2004) e ShZIS. A análise (tanto líquida quanto SPME) indicou que as enzimas sintetizam estereoisômeros diferentes. ShZIS é responsável pela produção de 7-epizingibereno (similar ao enantiômero encontrado em *S. habrochaites*), ao passo que ObZIS é uma alfa-zingibereno sintase legítima (Figura 3A, B).

Figura 3A:

Injeção líquida de amostras em hexano. Lavagem da folha de *S. habrochaites*: padrão para 7-epizingibereno (RT: 844). Óleo de gengibre: padrão para alfa-zingibereno (RT: 851) e S-curcumeno (RT: 829). Mistura de lavagem da folha e gingeroil: S-curcumeno (RT: 829), 7 epizingibereno (RT: 844) e alfa-zingibereno (RT: 851). Sobreposição com hexano de C41 de *E. coli* (DE3) transformado com pGEX: ZIS2 incubado com zFPP: 7-epizingibereno (RT: 844). Este experimento mostra a separação de 7-epizingibereno e alfa-zingibereno (anteriormente identificado com RMN em Bleeker *et al.*, 2011) na coluna quiral e mostra que a 7-epizingibereno sintase

(ShZIS) heterologamente expressada é responsável pelo 7-epizingibereno em PI127826. Também mostra que a planta F2 produz 7-epizingibereno.

Figura 3B:

SPME: Material de folha de *S. habrochaites* como padrão para
 5 7-epizingibereno (RT: 850) e R-curcumeno (RT: 841). Gingeroil como padrão
 para alfa-zingibereno (RT: 856) e S-curcumeno (RT: 835). ObZIS de
 manjerição doce (Iijima, R. Davidovich-Rikanati, E. Fridman, D. R. Gang, E.
 Barra, E. Lewinsohn, e E. Pichersky (2004). The Biochemical and Molecular
 Basis for the Divergent Patterns in the Biosynthesis of Terpenes and
 10 Phenylpropenes in the Peltate Glands of Three Cultivars of Basil. *Plant
 Physiology* 136; 3724-3736.) heterologamente expressado e fornecido com E-
 E-FPP fabricou alfa-zingibereno (RT: 856). PI127826 ShZIS heterologamente
 expressado e fornecido com Z-Z-FPP fabricou 7-epizingibereno (RT: 850).
 ObZIS e ShZIS misto mostrou ambos os picos. Estes experimentos mostram
 15 que ShZIS fabrica um estereoisômero de zingibereno diferente do que a
 ObZIS zingibereno sintase de planta conhecida.

Exemplo 3: Desenvolvimento de plantas de *S. Lycopersicum* transgênicas

Experimentos de transformação de explante de cotilédono de tomate

A linhagem C32 de tomate (*S. lycopersica*) foi usado para
 20 transformações com *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101). O protocolo de
 transformação de tomate foi descrito em Koornneef *et al* (1986) (Koornneef,
 Maarten, Jongsma, Maarten, Weide, Rob, Zabel, Pim, e Hille, Jacques.
 (1986); Transformation of tomato. Em: Tomato Biotechnology, Donald
 Nevins e Richard Jones, eds. Alan Liss Inc., Nova Iorque, USA, pg. 169-178.)
 25 e em Koornneef *et al* (1987) (Koornneef, M., Hanhart, C. J., e Martinelli, L.
 (1987); A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theor. Appl. Genet.*
 74: 633-641). O alvejamento específico de Tricoma foi garantido usando
 MKS1 (metilcetona sintase 1; Fridman *et al.*, 2005 (Fridman E, Wang J,
 Iijima Y, Froehlich JE, Gang DR, Ohlrogge J, Pichersky E (2005). A análise

metabólica, genômica, e bioquímica de tricomas glandulares da espécie de tomate do tipo selvagem *Lycopersicon hirsutum* identifica uma enzima chave na biossíntese de metilcetonas. Plant Cell 17: 1252–1267)) e MTS1 (monoterpeno sintase 1; WO2009082208) de *S. habrochaites* e *S. lycopersicum*, respectivamente. Para a cotransformação, *Agrobacterium* que carrega um binário vetor com pMKS1:zFPS e pMTS1:ShZIS onde culturas diluídas são misturadas em uma razão de 1:1. O resto do protocolo descrito foi inalterado. Quando brotos do tomate apareceram, eles foram colhidos e enraizados em meio MS20 sólido contendo 1 mg L⁻¹ de IBA, 200 mg L⁻¹ de cefotaxima, 200 mg L⁻¹ de vancomicina, e 100 mg L⁻¹ de canamicina.

O DNA genômico foi isolado das plantas transgênicas e a PCR foi realizada nas plantas T0 para confirmar a inserção bem sucedida dos plasmídeos. O material de folha de plantas T0 foi colhido e analisado pela GC-MS como descrito acima.

Resultados:

Bleeker *et al.* (2009) mostrou anteriormente que 7-epizingibereno é produzido pelo PI127826 de *S. habrochaites*. O gene responsável para a produção de 7-epizingibereno, chamado ShZIS, foi isolado a partir de PI127826 de *S. habrochaites*. Plantas transgênicas foram produzidas pela transformação mediada pela *Agrobacterium* de *S. lycopersicum* C32. Ao passo que nenhum 7-epizingibereno foi formado nas plantas de controle de *S. lycopersicum* (C32) ou plantas transformadas apenas com MKS1:zFPS, 7-epizingibereno foi presente nas plantas de *S. lycopersicum* transgênicas com zFPS e ShZIS inseridos no seu genoma (Figura 4).

Exemplo 5: Efeito da expressão da sequência de nucleotídeo que codifica a 7-epizingibereno sintase sobre a resistência à praga de inseto

Metodologia Bioensaios:

Um cruzamento interespécies entre *S. lycopersicum* e *S. habrochaites* foi realizado e linhagens F2 foram transferidas para a estufa na

University of Amsterdam. As plantas F2 foram testadas quanto a sua produção de 7-epizingibereno. Os cortes foram feitos de linhagens F2 que produzem 7-epizingibereno, *S. lycopersicum* C32 (moneymaker) e de *S. habrochaites* (PI127826). Ambas uma linhagem precursora do cruzamento inicial.

5 Bioensaio *B. tabaci* (mosca branca)

Dois cortes de genótipos PI127826 e C32 e as F2s respectivas receberam 4 gaiolas de grampo, cada uma das quais contiveram 20 *B. tabaci* adultos (biotipo Q) inicialmente coletado em Almeria (Sdor) e tratados continuamente no pepino sob condições de laboratório (ver Bleeker *et al.*, 2009 – Plant Physiol.). Depois de 5 dias, o número total e a porcentagem de moscas mortas e o número total de ovos (lados abaxial e adaxial combinados das folhas) foram determinados.

Além disso, o material de folha da mesma folhinha foi usado para determinar as concentrações de terpeno.

As plantas F2 tem níveis de 7-epizingibereno comparável com *S. habrochaites* (PI127826). 7-epizingibereno não foi detectado em *S. lycopersicum* (C32).

Resultados bioensaio de *B. tabaci*:

Cortes de uma planta F2 e *S. habrochaites* (PI127826) mostraram quantidades similares de 7-epizingibereno. Nenhum 7-epizingibereno pôde ser detectado em *S. lycopersicum* C32 (Figura 5). Além disso, a resistência aumentada às moscas brancas foi observado nos cortes da planta F2 e *S. habrochaites* (PI127826) (Figura 6A,B). Comparado com *S. habrochaites* e plantas F2, a porcentagem dos adultos mortos depois de 5 dias foi significativamente mais baixa na *S. lycopersicum* (Figura 6A; ANOVA de uma via, LSD; $p < 0,05$ para ambas as comparações). Além disso, o número de ovos depositados pelas fêmeas adultas de *B. tabaci* foi significativamente mais alta na *S. lycopersicum* C32 comparada com F2 ou plantas *S. habrochaites* (Figura 6B; ANOVA de uma via, LSD; $p < 0,05$ para ambas as

comparações). As características tanto de mortalidade quanto de oviposição mostram que o 7-epizingibereno produzido pelas plantas realça a resistência às moscas brancas.

Bio-ensaio Besouro da batata do Colorado (CPB)

5 As larvas do CPB, *Leptinotarsa decemlinegemata* (ordem: *Coleoptera*) foram criados sobre batata (cultivar Bintje). Um ensaio que não de escolha foi realizado por 24 horas. As larvas de CPB (recém-nascidas) foram deixadas alimentar em discos de folha (1,2 cm de diâmetro) de plantas F2 que surgem de um cruzamento interespecies entre *S. lycopersicum* (C32) e
10 *S. habrochaites* (PI127826).

A planta F2 40 mostra altos níveis de zingibereno (similar ao *S. habrochaites*), ao passo que a planta F2 45 produziu apenas níveis muito pequenos de zingibereno. Os discos de folha de ambos os genótipos foram colocados em papel de filtro umedecido em uma placa de Petri e uma larva foi
15 deixada alimentar-se por 24 horas (10 réplicas biológicas por genótipo de planta). Subsequentemente, a sobrevivência das larvas e o dano da alimentação foram avaliados.

Resultado Bio-ensaio CPB

Os níveis de 7-epizingibereno foram medidos usando o método
20 descrito acima. A planta F2 40 mostra alta concentração de 7-epizingibereno, ao passo que a planta F2 45 produz apenas níveis muito pequenos de 7-epizingibereno (concentração no limite de detecção; Figura 7A).

A sobrevivência das larvas depois de 24 horas de alimentação foi significativamente diferente nos dois genótipos. Apenas 20 % das larvas
25 sobreviveram na planta F2-40 que produz 7-epizingibereno alto. Ao contrário, a maioria das larvas sobreviveram (70 %) e foram alimentadas da planta de baixa produção (F2-45; Figura 7B).

O dano da alimentação foi avaliado pela triagem dos discos de folha. Significativamente mais dano foi observado nas plantas com 7-

epizingibereno baixo (planta F2-45; Figura 7C). Além disso, o dano devido à alimentação de CPB foi quantificado pelo uso de ImageJ. A análise determina o número de pixels (unidades arbitrárias) de discos de folha escaneados. O dano foi determinado como o número de pixels para os discos de folha não danificados comparados com aquele de discos de folha danificados pelo CPB. A Figura 7D indica que significativamente mais dano foi observado nos discos de folha da planta F2-45, comparado ao F2-40 (produção de 7-epizingibereno alta).

Bio-ensaio *Trialeurodes vaporariorum* (mosca branca da estufa)

Trialeurodes vaporariorum (ordem: *Hemiptera*) foram criadas sobre tomate (*S. lycopersica*). Um ensaio de escolha foram realizados por 24 horas. Os adultos foram liberados em uma gaiola com duas plantas F2 que surgem de um cruzamento interespécies entre *S. lycopersicum* (C32) e *S. habrochaites* (PI127826). Subsequentemente, a preferência de depósito de adulto foi determinada nas folhas das plantas F2 que seguem (10 folhas por planta). A planta F2 40 mostraram altos níveis de 7-epizingibereno (similar à *S. habrochaites*), ao passo que a planta F2 45 produziu apenas níveis muito pequenos de 7-epi- zingibereno (Figura 7A).

Resultados Bio-ensaio *Trialeurodes vaporariorum*

A preferência da mosca branca da estufa foi diferente nos dois genótipos (Figura 8). Comparado com as plantas que produzem 7-epizingibereno alto (F2-40), duas vezes tantos adultos de mosca branca de estufa depositaram quanto nas plantas que produzem 7-epizingibereno baixo (F2-45).

Bio-ensaio de *Macrosiphum euphorbiae* (afídio da batata/tomate)

Macrosiphum euphorbiae (ordem: *Hemiptera*) foram criados no tomate (*S. lycopersica*). Um ensaio que não de escolha foi realizado por 48 horas. Um afídio adulto foi colocado em uma gaiola com grampo em cada uma de duas plantas F2 que surgem de um cruzamento interespécies entre *S. lycopersicum* (C32) e *S. habrochaites* (PI127826). Subsequentemente, o

desempenho de afídio (sobrevivência e número de descendentes) foi determinado nas plantas F2 que seguem (3 gaiolas com grampo por planta; 6 plantas por genótipo). A planta F2 40 mostra altos níveis de 7-epizingibereno (similar a *S. habrochaites*), ao passo que a planta F2 45 produziu apenas

5 níveis muito pequenos de 7-epizingibereno (Figura 7A).

Resultados Bio-ensaio *Macrosiphum euphorbiae*

O desempenho de afídio foi diferente nos dois genótipos (Figura 9). Comparado com as plantas que produzem 7-epizingibereno alto (F2-40), os afídeos desempenharam melhor em termos de sobrevivência e

10 número de descendentes produzidos nas plantas que produzem 7-epizingibereno baixo (F2-45).

Bio-ensaio *Tuta absoluta*

Tuta absoluta (ordem: *Lepidoptera*) foram criados em tomate (*S. lycopersica*). Um ensaio de escolha foi realizado por 7 dias. 5

15 adultos foram deixados ovipositar seus ovos sobre plantas *S. lycopersicum* (C32) e nas plantas F2 que surgem de um cruzamento interespécies entre *S. lycopersicum* (C32) e *S. habrochaites* (PI127826). Depois de 7 dias, a oviposição de *Tuta absoluta* (número de ovos depositados) foi determinada nos lados abaxial e adaxial de seis folhas por genótipo de planta. As plantas

20 F2 foram caracterizadas pelo conteúdo de 7-epizingibereno depois do ensaio e a oviposição de *Tuta absoluta* (número de ovos depositado) foi correlacionada com o conteúdo de 7-epizingibereno.

Resultados Bio-ensaio *Tuta absoluta*

A oviposição pelas fêmeas de *Tuta absoluta* foi

25 significativamente reduzida nas plantas F2 que produzem 7-epizingibereno (Fig. 10a). A Figura 10b indica a concentração de 7-epizingibereno nas plantas F2 testadas quanto à oviposição da *Tuta absoluta*. A oviposição foi negativamente correlacionada com o conteúdo de 7-epizingibereno (combinação das Figuras 10A e 10B).

Bio-ensaio ácaros aranha

Ácaros aranha, como insetos, pertencem aos artrópodes mas são uma classe diferente de organismos. O efeito da 7-epizingibereno foi testado nas duas espécies de ácaro aranha, *Tetranychus urticae* e *T. evansi*.

5 Ambas as espécies de artrópode foram criadas em feijão de jardim comum. Um ensaio que não de escolha de 4 dias foi realizada com populações sincronizadas de *T. urticae* e *T. evansi*. Os ácaros foram colocados em discos de folha de plantas de controle susceptíveis (*S. lycopersica*), plantas *S. habrochaites* PI127826 resistentes e nas plantas de *S. lycopersicum* transgênicas que produzem 7-epizingibereno (linhagem 2).
10 Subsequentemente, a sobrevivência e fecundidade de ácaro (número de ovos/ácaro) foi avaliada. As plantas transgênicas foram fabricadas como descrito acima. Em resumo, as plantas foram cotransformadas com duas construções para produzir 7-epizingibereno em tricomas glandulares de *S. lycopersicum* (pMKS1:zFPS e pMTS1:ShZIS). Neste experimento uma
15 linhagem transgênica foi usada (linhagem 2).

Resultados Bio-ensaio ácaros aranha

A fecundidade de ácaro foi reduzida pela produção de 7-epizingibereno em plantas transgênicas de *S. lycopersicum*. Comparadas com *S. lycopersicum*, as plantas transgênicas que produziram 7-epi-zingibereno
20 mostraram sobrevivência de ácaro reduzida (ambas as espécies). Além disso, as Figuras 11A e 11C indicam uma forte redução da fecundidade de ácaro (ovos/ácaro) tanto para *T. urticae* quanto para *T. evansi*, 81 % e 54 % de redução, respectivamente.

25 A sobrevivência global também foi impactada para ambas as espécies de ácaro aranha. As Figuras 11B e 11D indicam que a porcentagem de ácaros aranha mortos foi mais alta nas plantas transgênicas que produzem a 7-epizingibereno comparadas com as plantas de *S. lycopersicum* que não produzem 7-epizingibereno (*S. lyc* 32).

Exemplo 5: Produção de 7-epi-zingibereno em várias plantas

Arabidopsis thaliana, *Nicotiana tabacum*, *Cucumis melo*, *Lactuca sativa*, *Glicina max*, e *Gossypium hirsutum* são cotransformadas com ShzFPS (precursor de zFPP adicional) e ShZIS (que codifica a 7-epizingibereno sintase). A produção de 7-epi-zingibereno nas folhas de plantas cotransformadas é comparada com a produção de 7-epi-zingibereno em plantas transformadas com simulado da mesma espécie. *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Cucumis melo*, *Lactuca sativa*, *Glicina max*, e *Gossypium hirsutum* são capazes de produzir 7-epi-zingibereno.

REIVINDICAÇÕES

1. Gene quimérico **caracterizado** pelo fato de que compreende um promotor operacionalmente ligado a uma molécula de ácido nucleico, em que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de ácido nucleico selecionada de um grupo que compreende:

- a) a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO:2; e
- b) a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 2 e da SEQ ID NO:4.

2. Vetor **caracterizado** pelo fato de que compreende o gene quimérico conforme definido na reivindicação 1.

3. Célula hospedeira **caracterizada** pelo fato de que compreende o vetor conforme definido na reivindicação 2, em que a célula hospedeira é uma célula hospedeira procariótica, fúngica ou de levedura.

4. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada** pelo fato de que a célula hospedeira procariótica é *Agrobacterium*, preferencialmente *Agrobacterium tumefaciens*.

5. Método para produzir uma planta transgênica possuindo resistência aumentada à praga de inseto comparada a uma planta de controle não transgênica, o dito método **caracterizado** pelo fato de que compreende as etapas de:

- (a) transformar uma planta ou célula de planta com uma molécula de ácido nucleico conforme definida na

reivindicação 1 , operacionalmente ligada a um promotor ativo em células de planta, e

(b) regenerar uma planta.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a dita molécula de ácido nucleico é integrada dentro do genoma da dita planta.

7. Método, de acordo com a reivindicação 5 ou 6 , **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda a etapa de:

(c) triar a planta regenerada, ou uma planta derivada da mesma pela autopolinização ou cruzamento, compreendendo a molécula de ácido nucleico conforme definida na reivindicação 1, quanto a resistência a uma ou mais pragas de inseto e identificar uma planta que compreenda resistência aumentada a uma ou mais das ditas pragas de inseto.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o dito promotor é um promotor induzível pela praga de inseto.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 8, **caracterizado** pelo fato de que a planta pertence à família *Solanaceae*.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a planta é do gênero *Solanum*.

11. Método, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 5 a 10, **caracterizado** pelo fato de que o método compreende ainda a etapa de:

- transformar a planta ou célula de planta com uma molécula de ácido nucleico possuindo a SEQ ID NO: 5, operacionalmente ligada a um promotor ativo em células de planta.

12. Uso de uma molécula de ácido nucleico conforme definida na reivindicação 1 **caracterizado** pelo fato de ser para a geração de plantas que têm uma produção de 7-epizingibereno aumentada quando comparada com plantas que carecem da dita sequência de aminoácido.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de ser para a geração de plantas resistentes à praga de inseto.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, **caracterizado** pelo fato de que as plantas são plantas de *Solanum lycopersicum*.

Figura 1

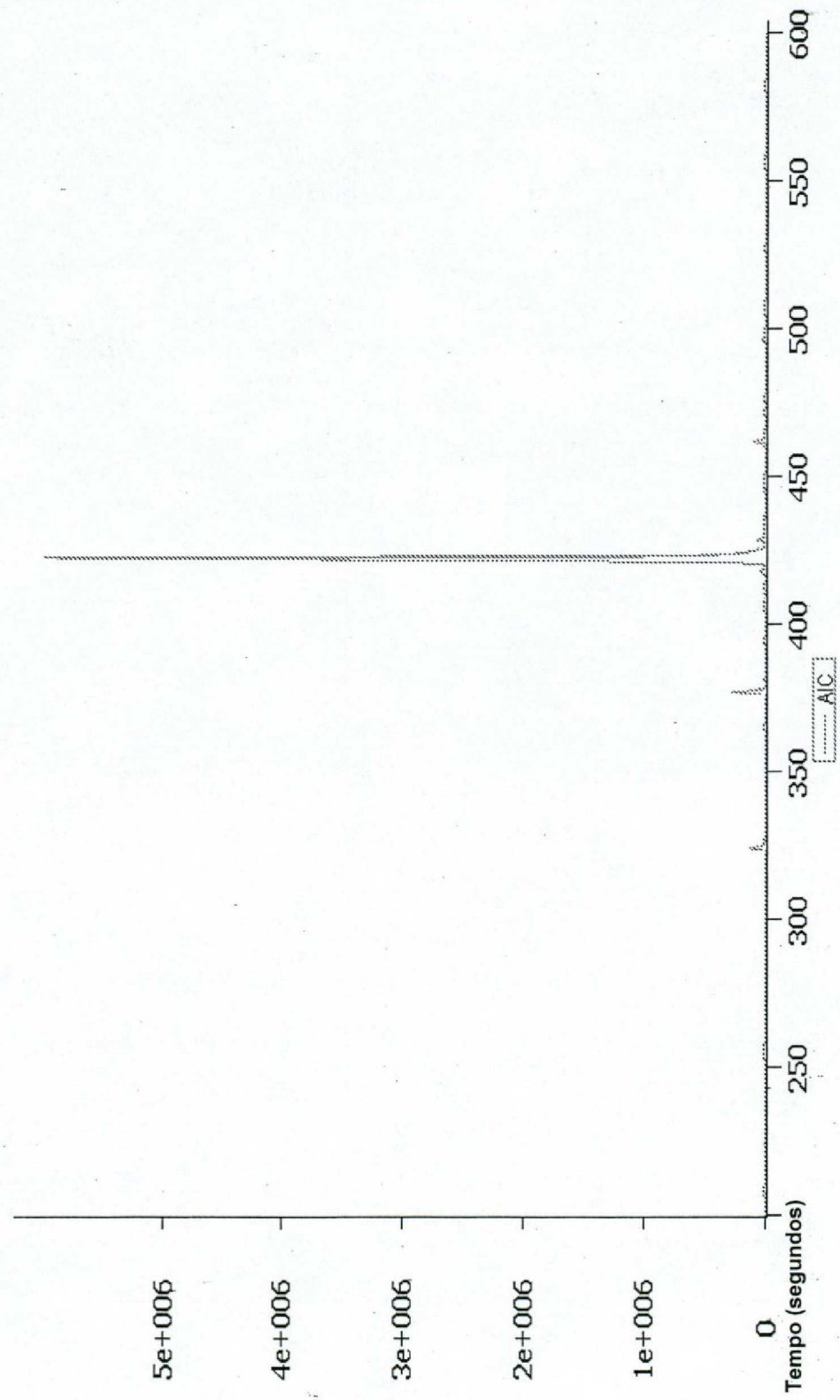


Figura 2A

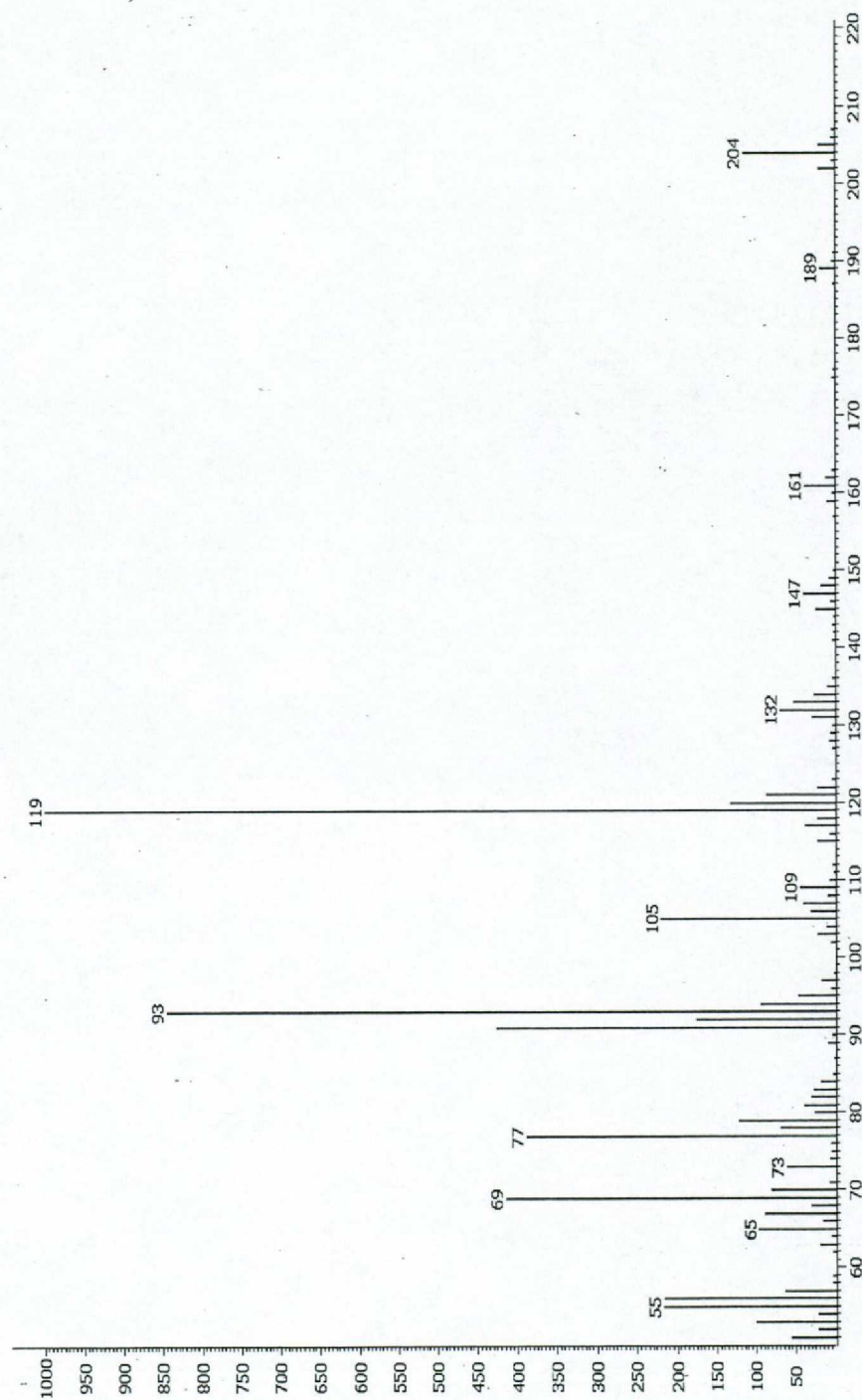


Figura 2B

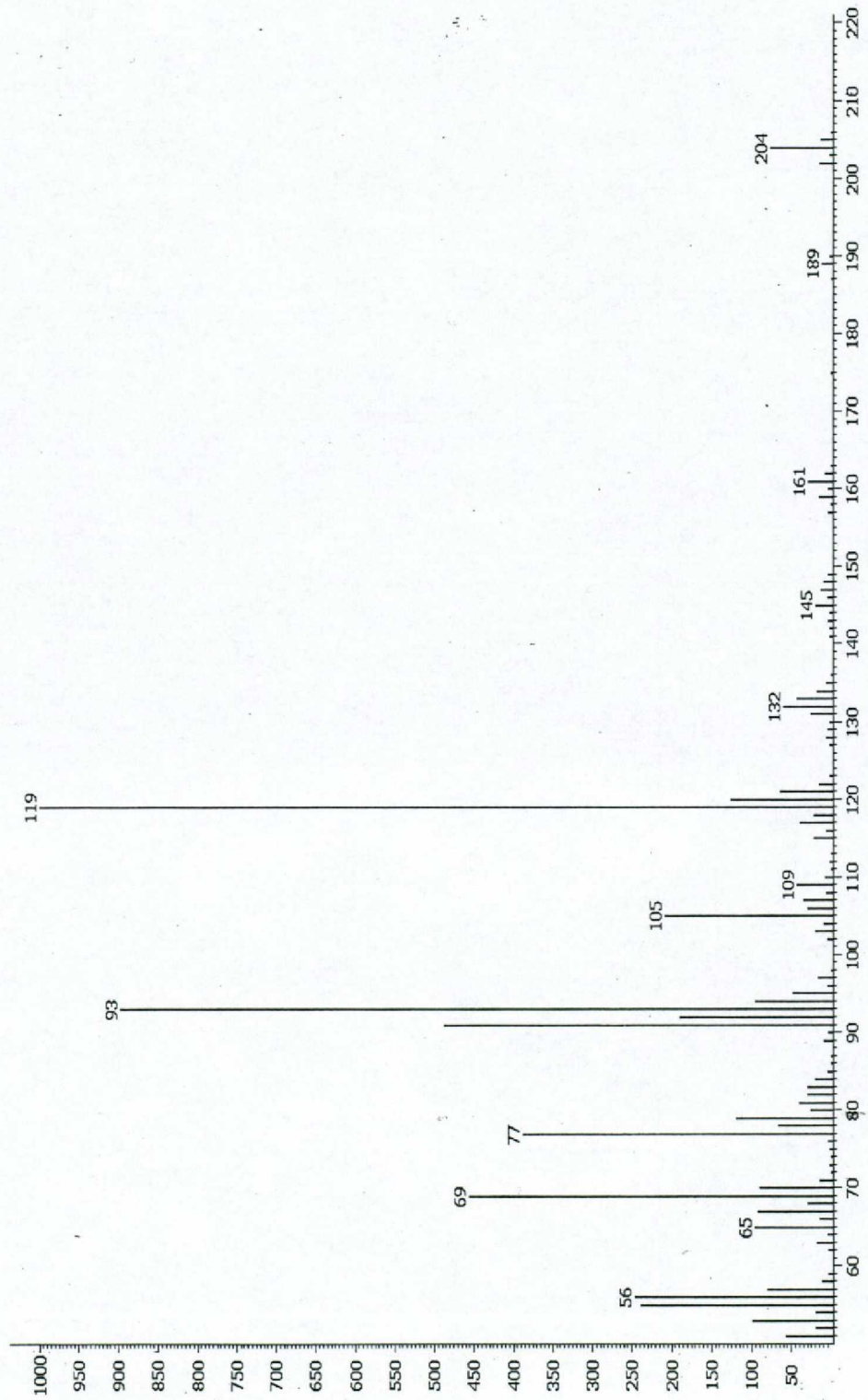


Figura 3A

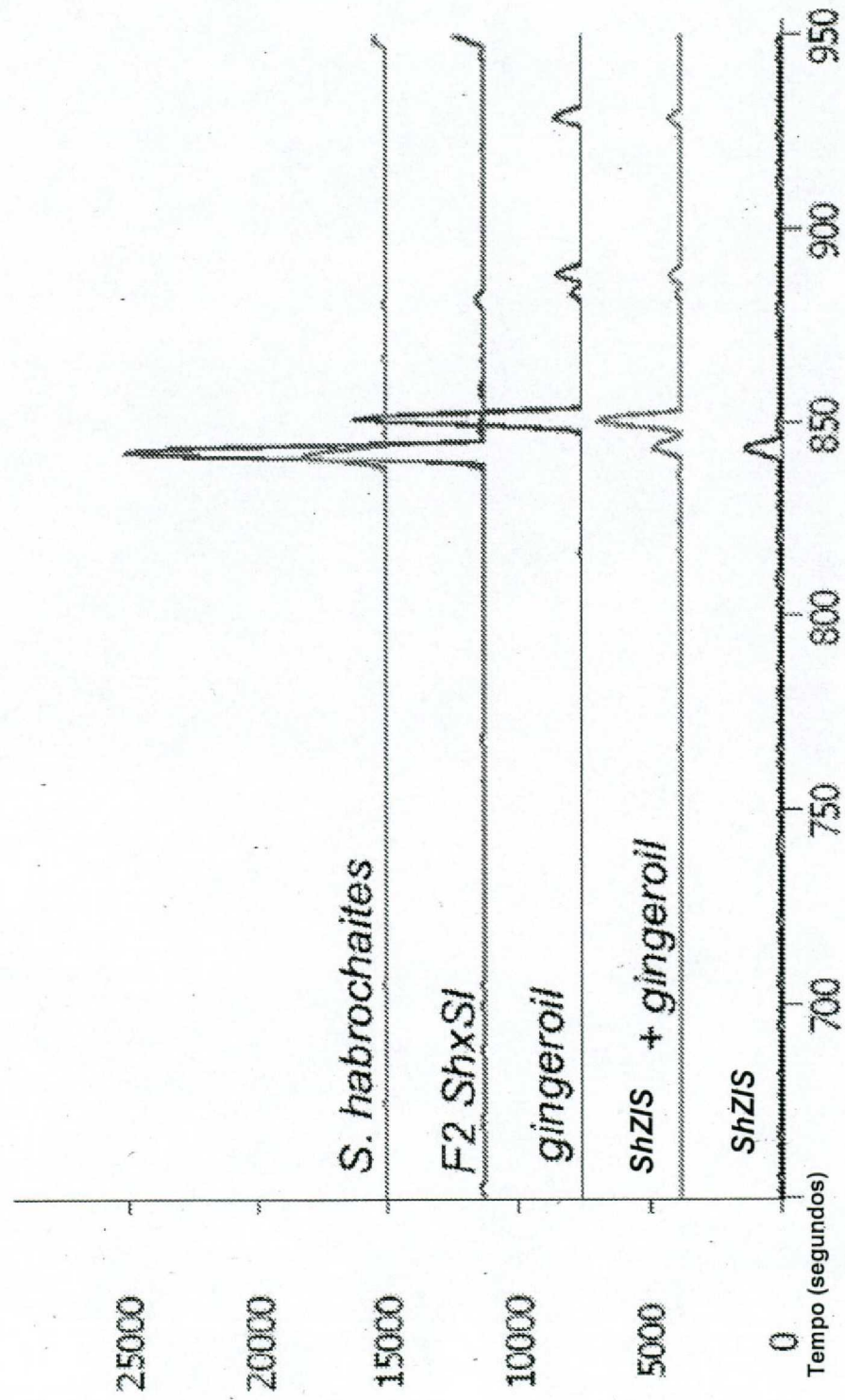


Figura 3B

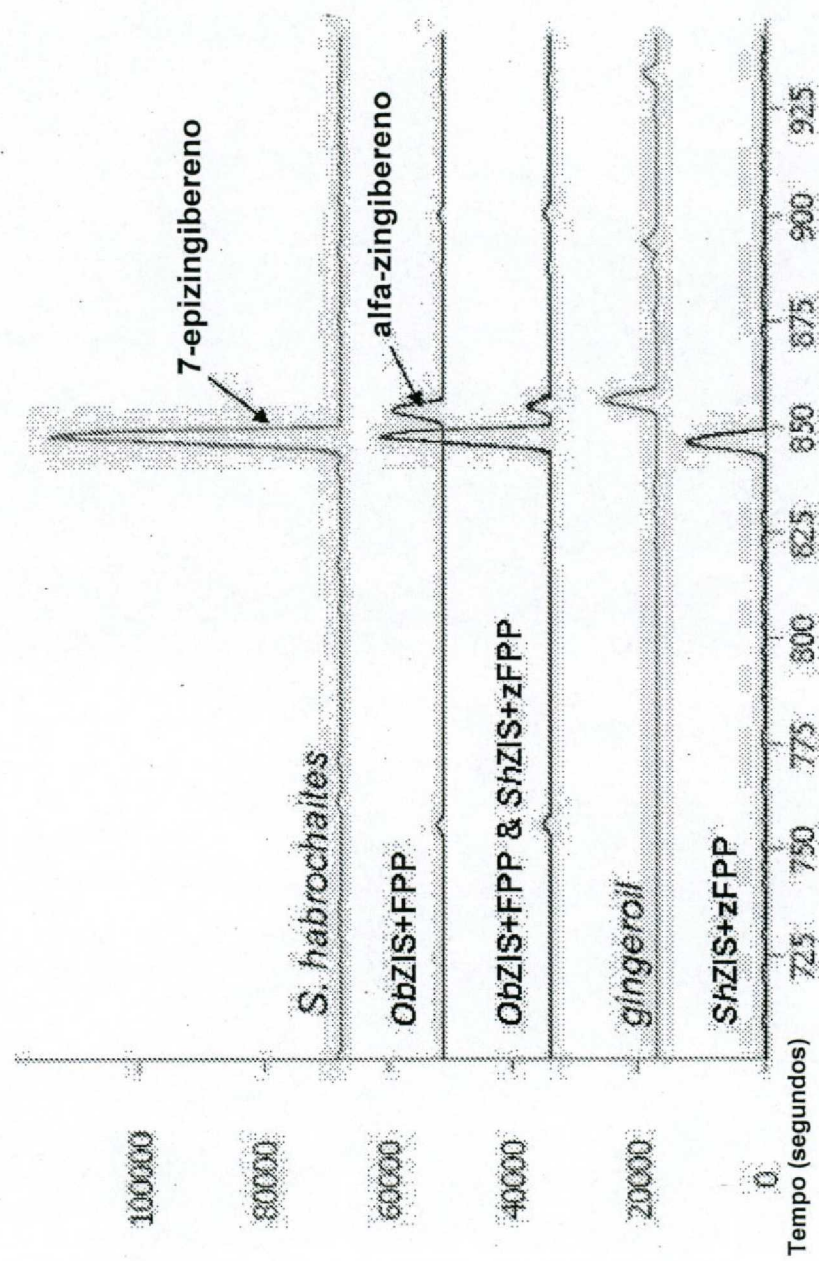


Figura 4A

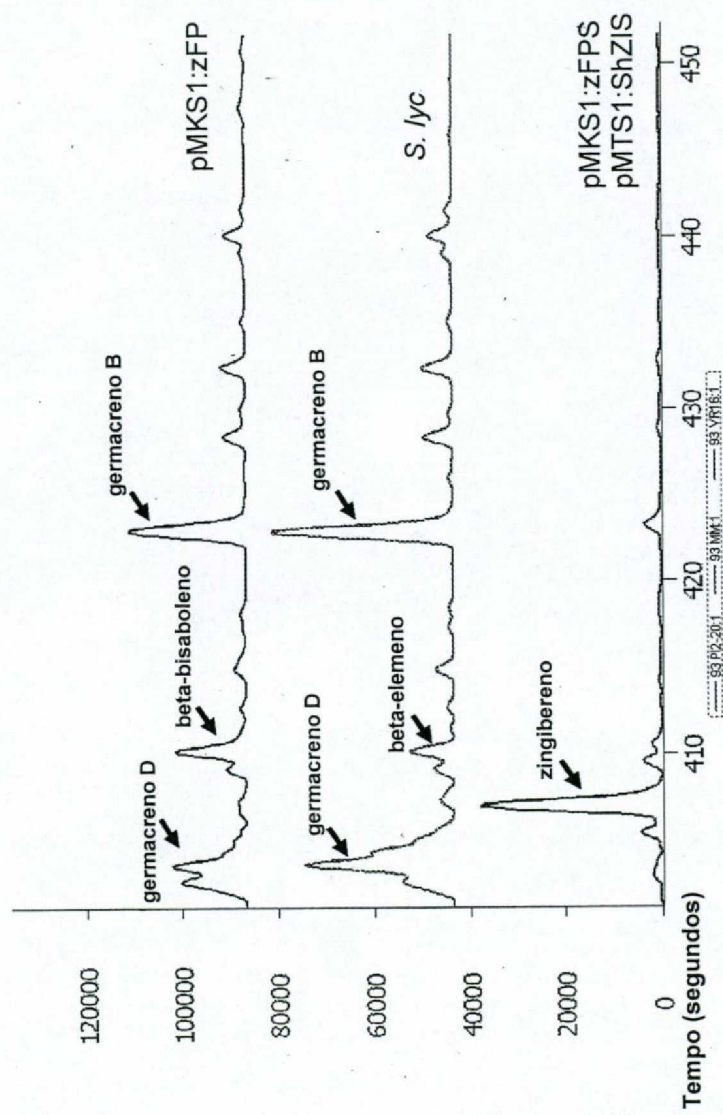


Figura 4B

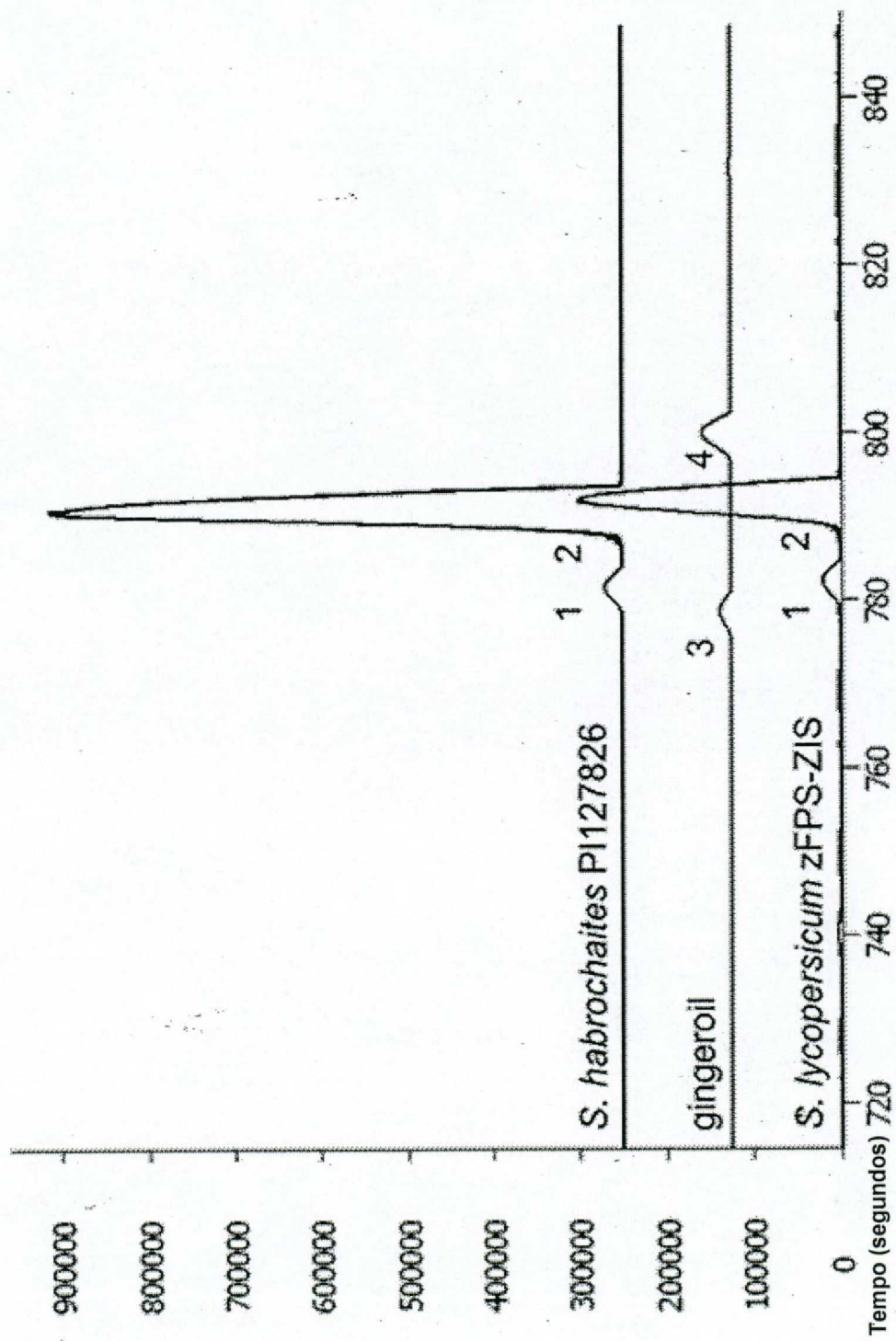


Figura 5

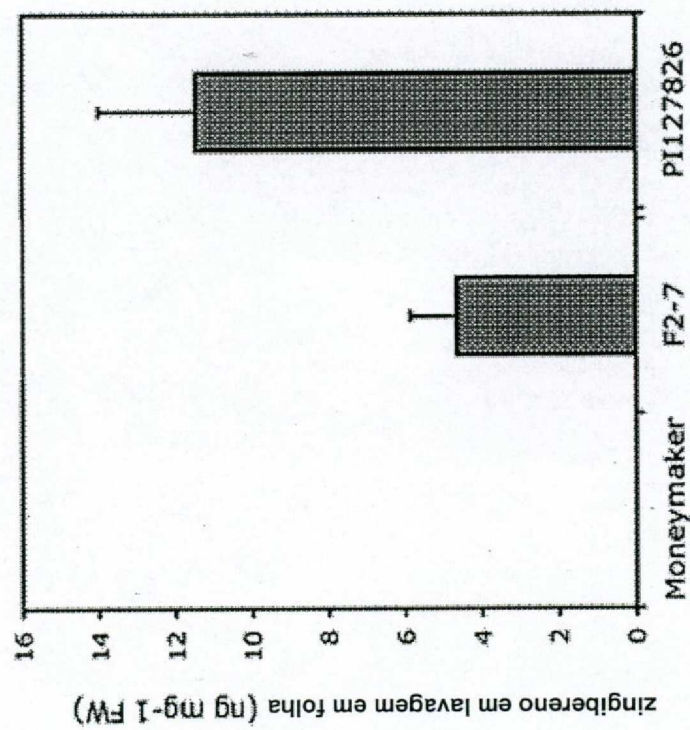


Figura 6A

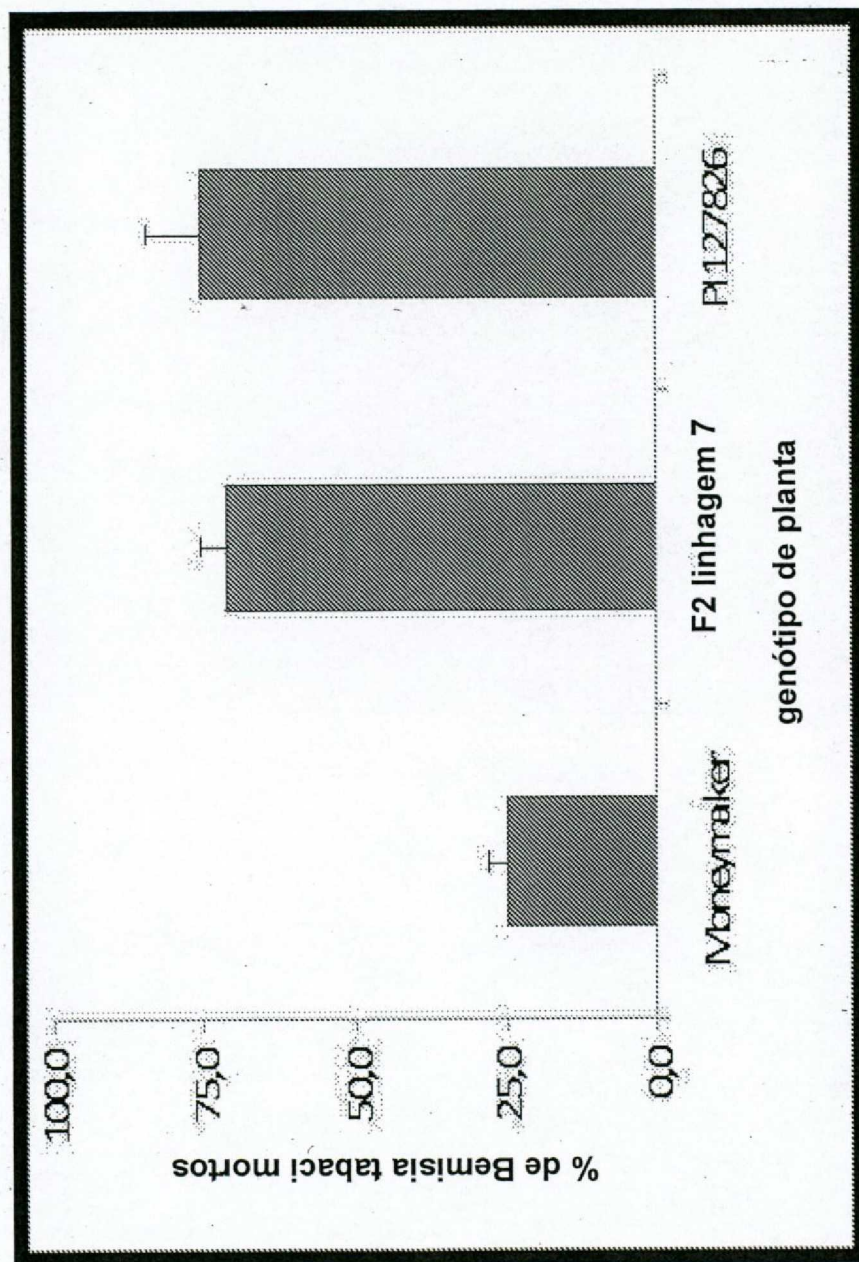


Figura 6B

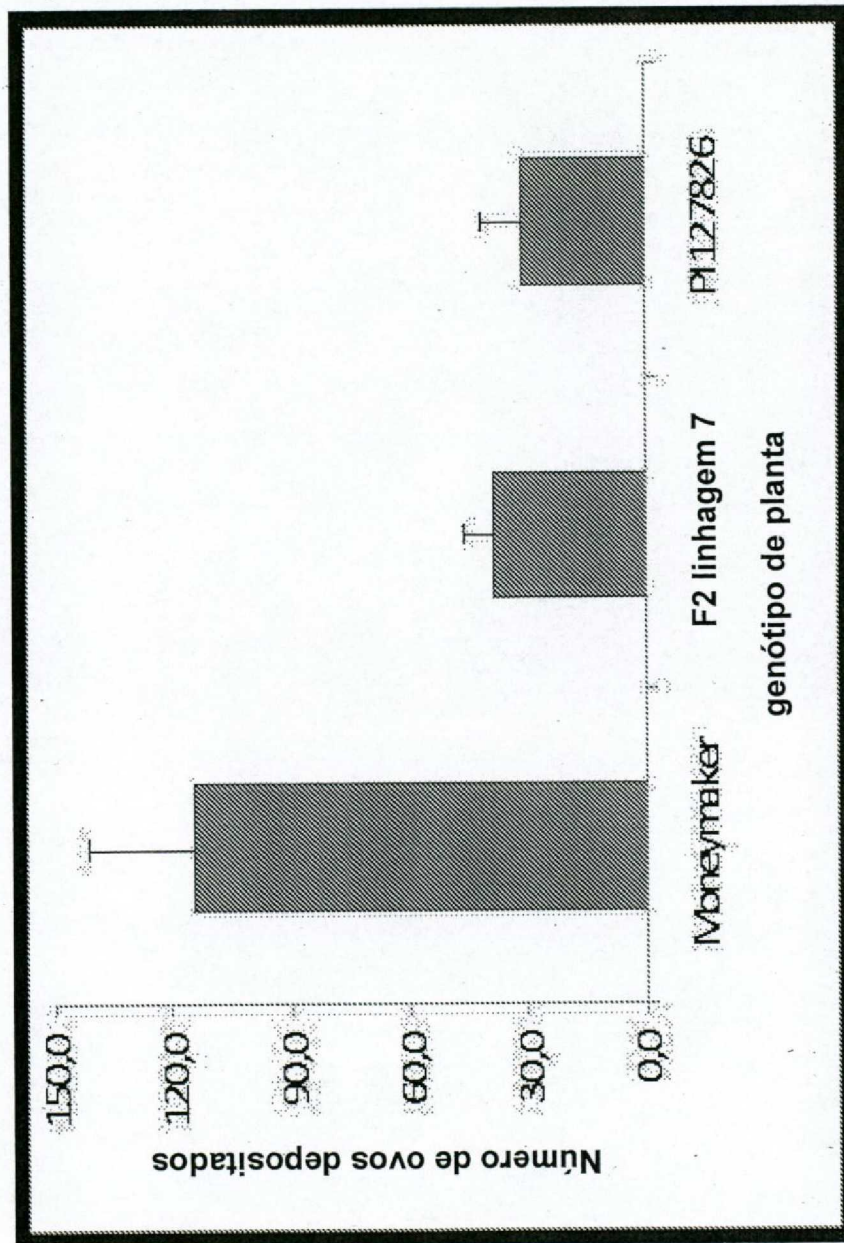


Figura 7A

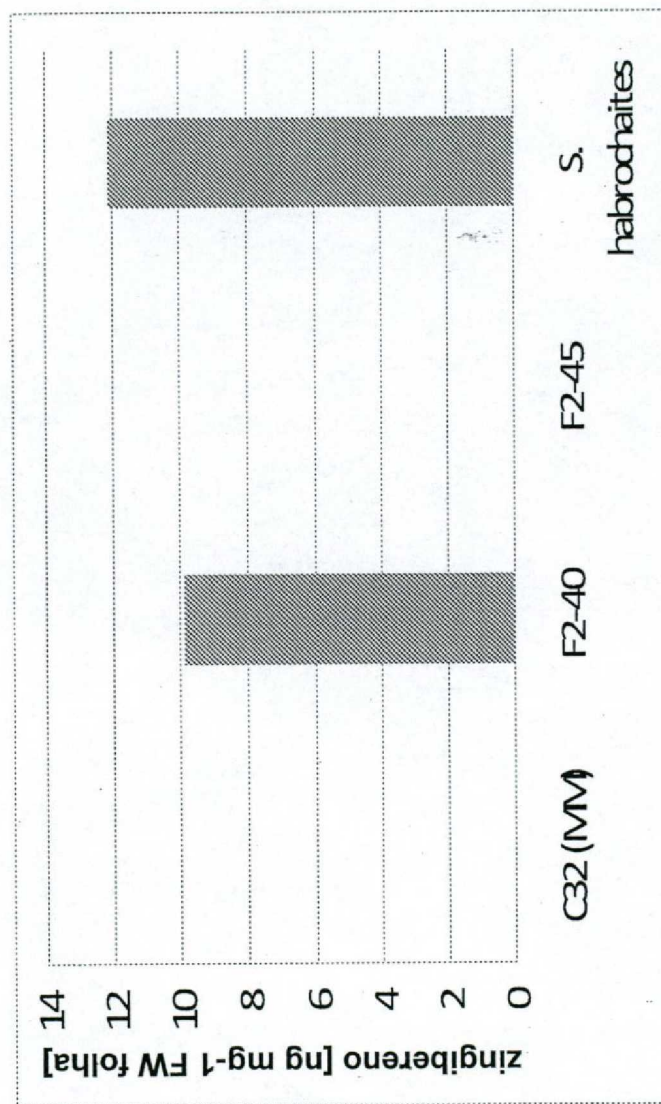


Figura 7B

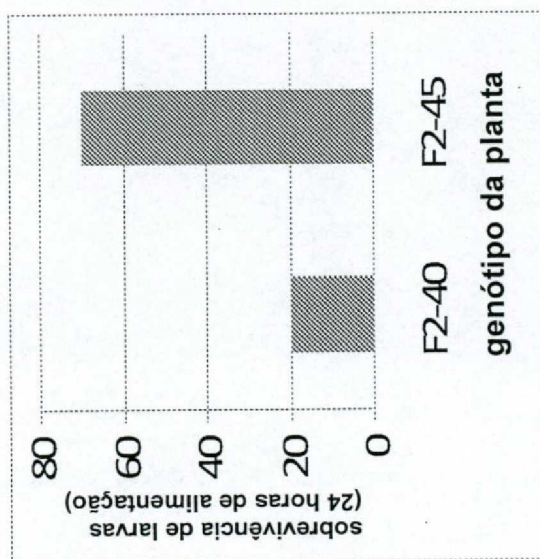


Figura 7C

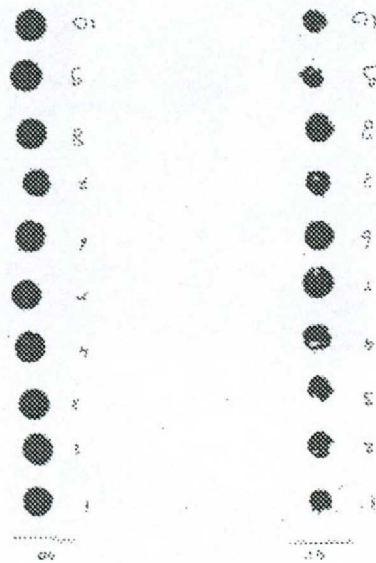


Figura 7D

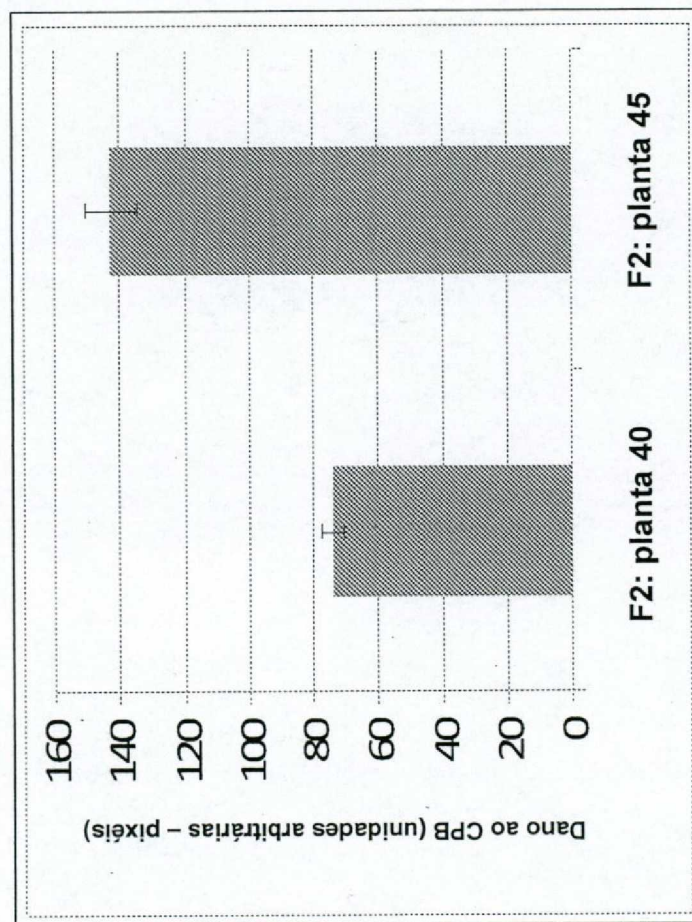


Figura 8

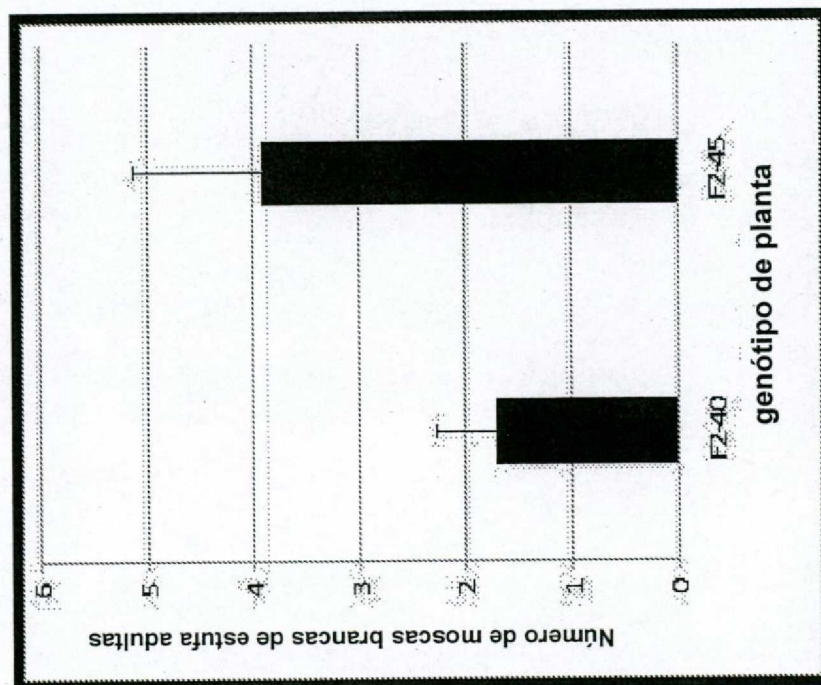


Figura 9

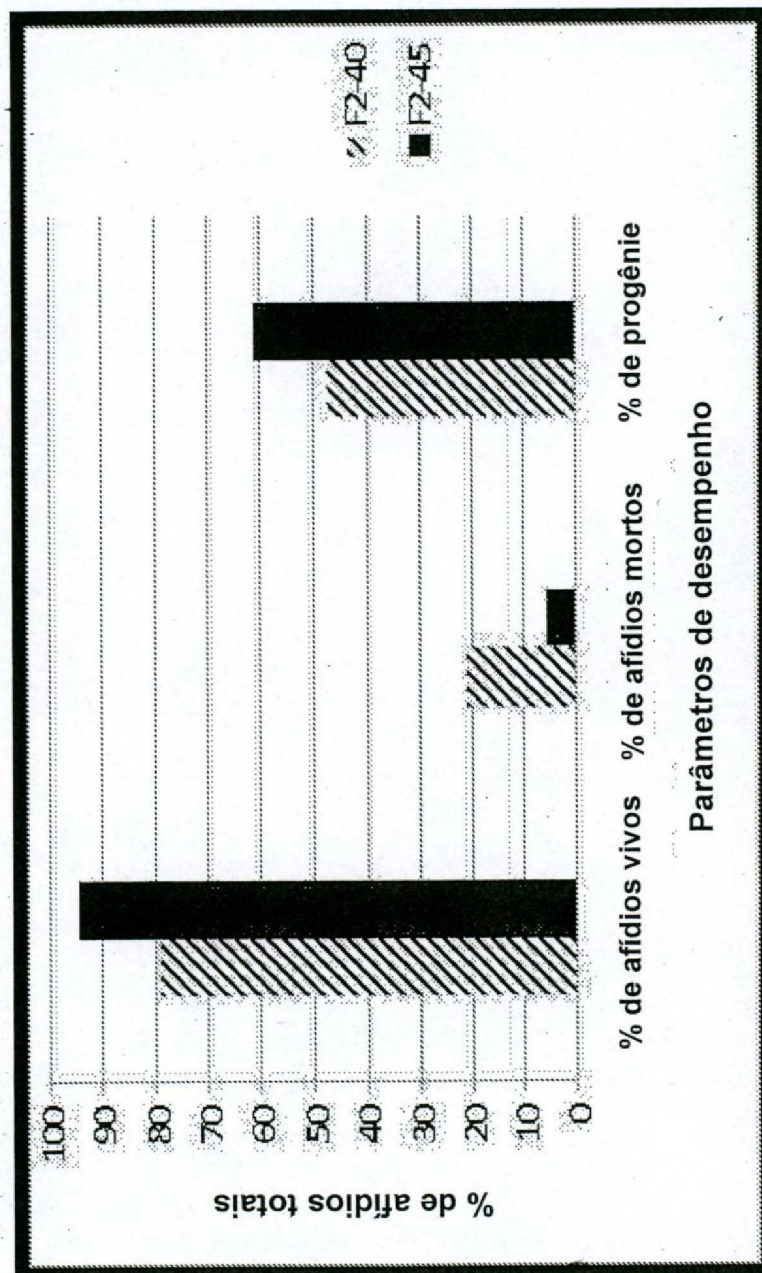


Figura 10A

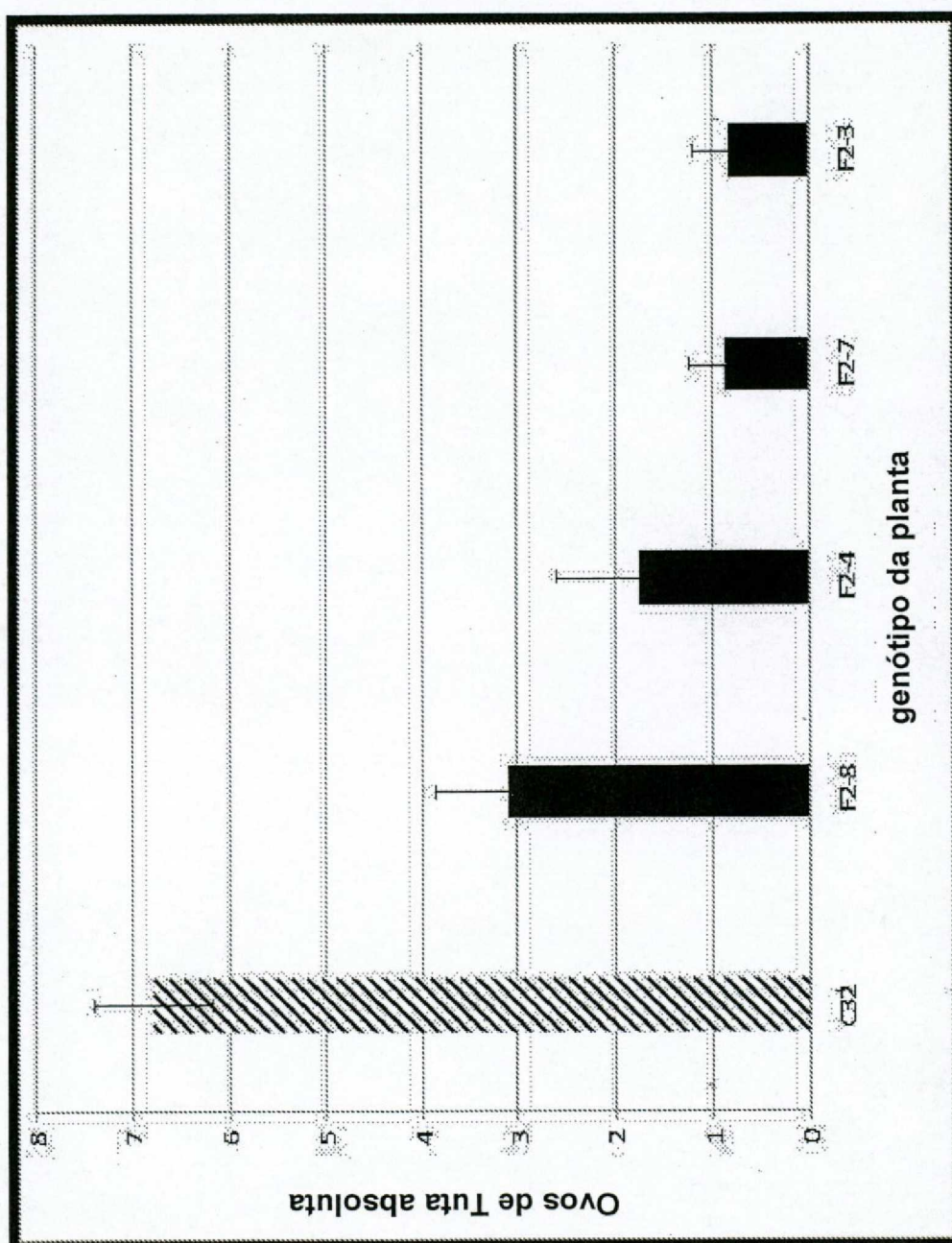


Figura 10B

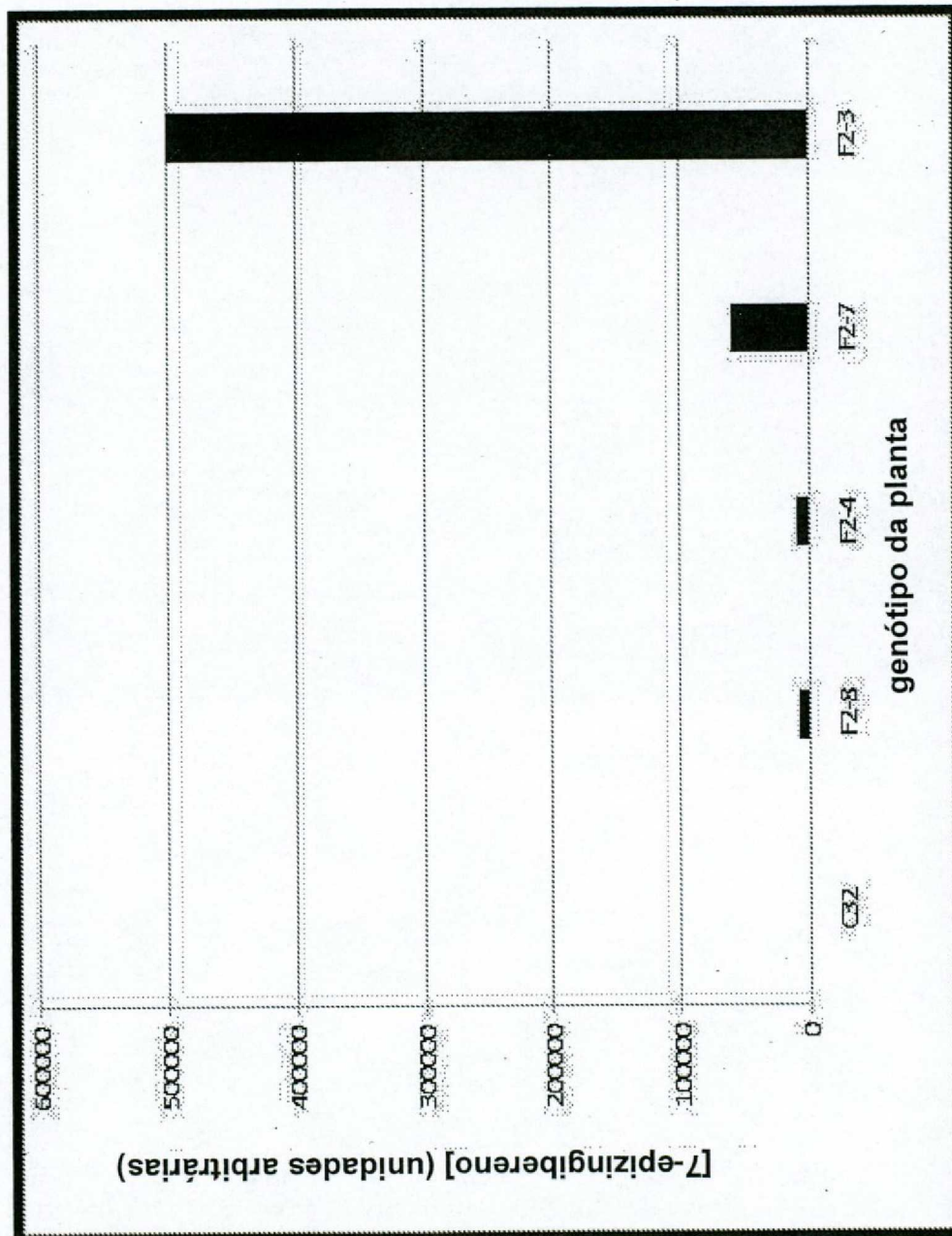


Figura 11A

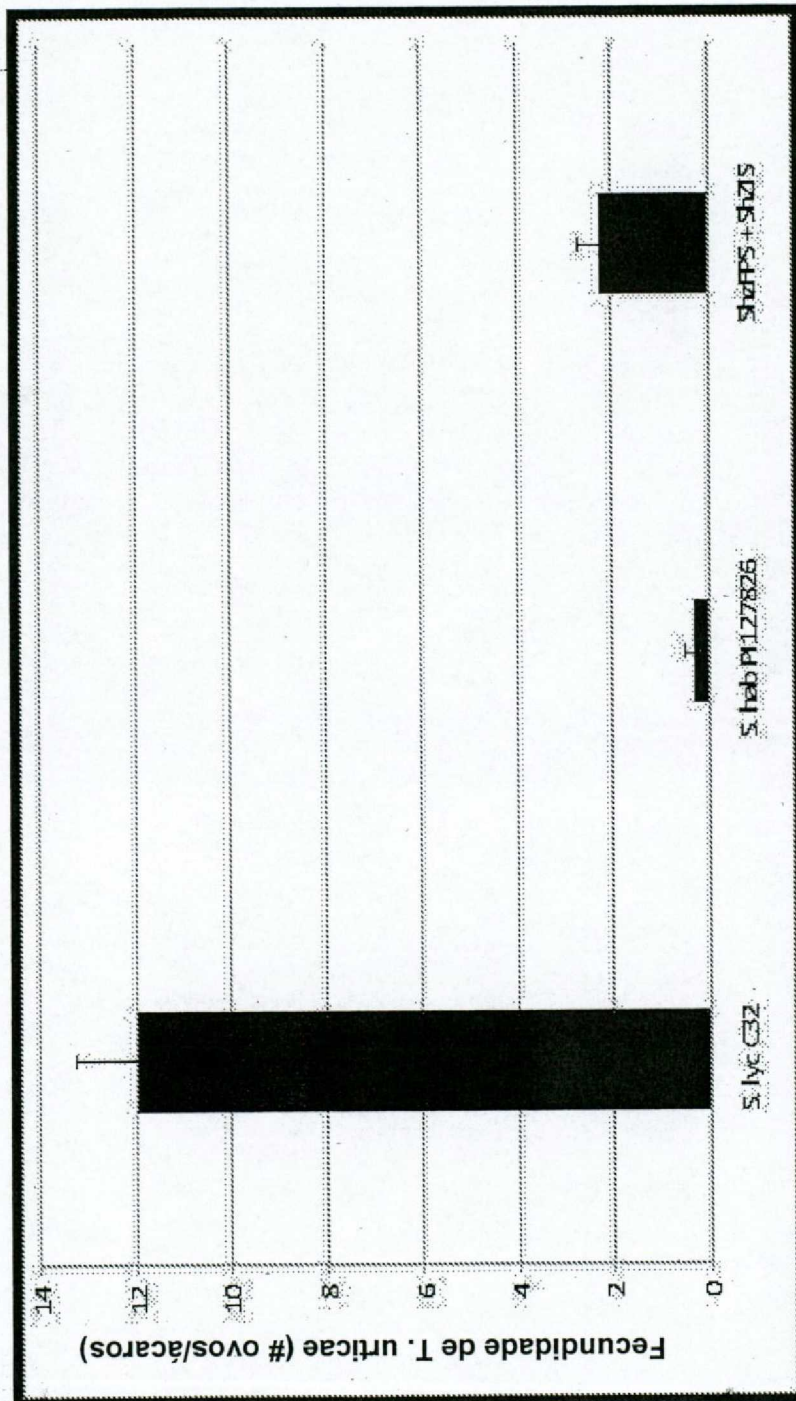


Figura 11B

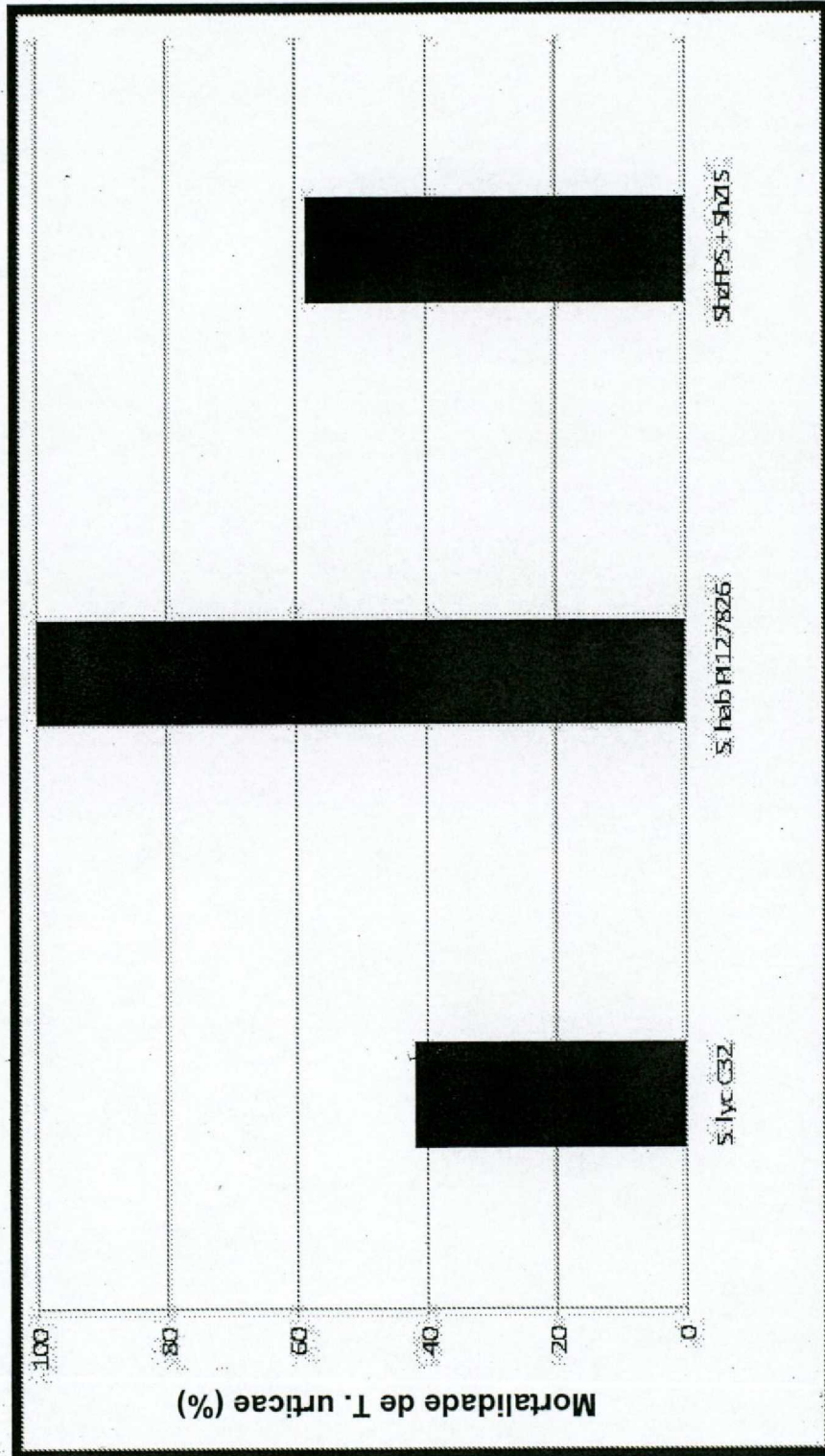


Figura 11C

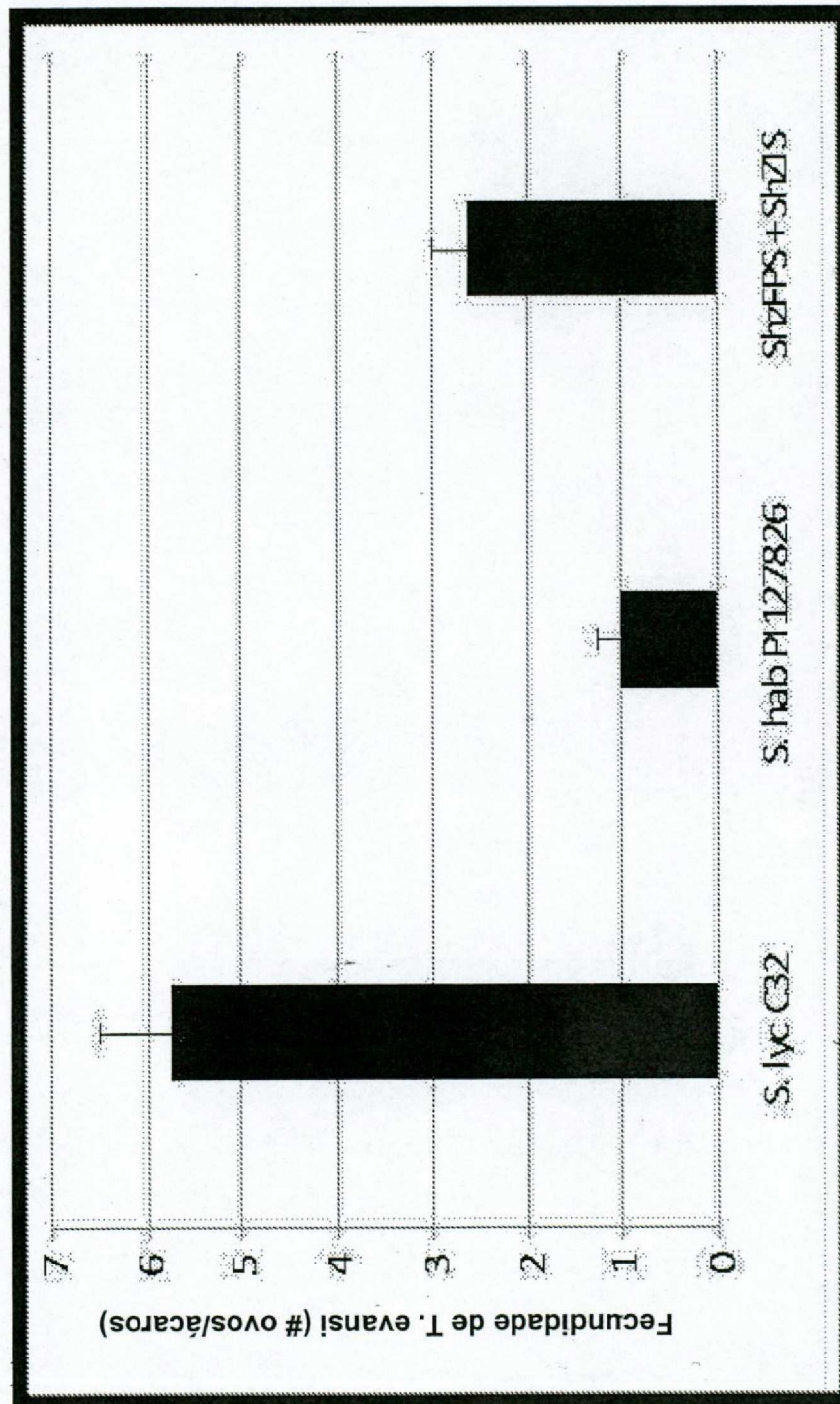


Figura 11D

