

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
3 de Julho de 2014 (03.07.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2014/100880 A2

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C12N 15/32 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2013/000609

(22) Data do Depósito Internacional :
27 de Dezembro de 2013 (27.12.2013)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
BR 10 2012 033542 5
28 de Dezembro de 2012 (28.12.2012) BR

(71) Requerentes : EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA [BR/BR]; EMBRAPA Ed. Sede, PQEB, W3 Norte Final, Asa Norte, 70770-901 Brasília - DF (BR). FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - FUB - UNB [BR/BR]; Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília - DF, 1 (BR).

(72) Inventores : GROSSI DE SÁ, Maria Fátima; RSCENTR 01, BI H, Apto. 306, Conj. 36, Ilhas do Lago, 70800-110 Brasília - DF (BR). MATTAR DA SILVA, Maria

Cristina; AOS 2 Bloco A Ap. 403 - Octogonal, 70660-021 Brasília - DF (BR). GOMES JÚNIOR, José Edilson; STN Lote K Bloco I Ap 116, Asa Norte, 70770-900 Brasília - DF (BR). TRISTAN LOURENÇO, Isabela; SQN 104 BL D, Ap. 101, Asa Norte, 70733-040 Brasília - DF (BR). LIMA PEPINO DE MACEDO, Leonardo; STN, Lote K, Bloco II, Ed. Montreal, Asa Norte, 70770-100 Brasília - DF (BR). LUCENA, Wagner Alexandre; SHIN, CA 2, BI. D, Apto. 125, Lago Norte, 71503-502 Brasília - DF (BR). CAMPOS DE ASSIS FONSECA, Fernando; Colina, Universidade de Brasília, bloco A, Apto 34, Asa Norte 70910-900 Brasília - DF (BR).

(74) Mandatário : DANNEMANN, SIEMSEN, BIGLER & IPANEMA MOREIRA; Caixa Postal 2142, Rua Marquês de Olinda, 70, 22251-040 - Rio de Janeiro - RJ - (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : SYNTHETIC VARIANT MOLECULES OF CRY1IA12 TOXINS CAPABLE OF CONTROLLING INSECT PESTS, COMPOSITIONS CONTAINING THESE MUTANTS AND METHOD OF USING THE SAME

(54) Título : MOLÉCULAS VARIANTES SINTÉTICAS DE TOXINAS CRY1IA12 COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS

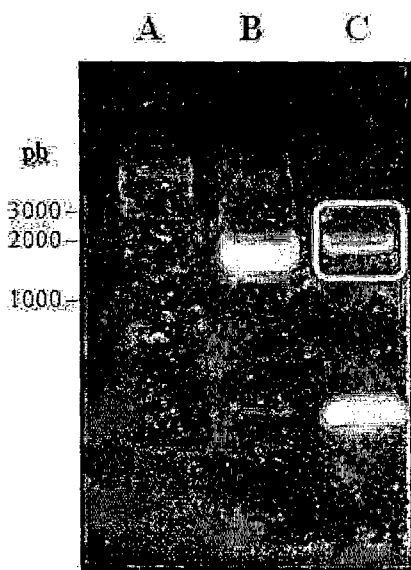


Fig. 1

(57) Abstract : The present invention relates to the field of insect pest control with methods and compositions that comprise mutant analogues of δ -endotoxins. More specifically, the present invention aims at providing new molecules from the Cry1Ia12 gene with improved toxicity in order to render sugar cane plants resistant to the sugar cane stem borer (*Telchin licus*), producing transgenic plants capable of expressing toxins with high entomotoxic activity; at providing improved δ -endotoxins by bioengineering processes; at helping reducing the dosage of agrochemicals applied, thus reducing social and environmental costs and increasing agricultural productivity. Other aspects of the invention include gene constructs containing the nucleic acid molecules that code for the modified Cr1Ia12, heterologous expression methods of the new molecules in the active form, and the use of these molecules for controlling insect pests. The invention also provides synthetic analogue genes optimised for their transformation and expression in plants.

(57) Resumo : A presente invenção refere-se ao campo de controle (Continua na página seguinte)



WO 2014/100880 A2



RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Estados Designados (*sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

Publicado:

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

de insetos-praga, utilizando métodos e composições que compreendem análogos mutantes de δ -endotoxinas. Mais especificamente, a presente invenção tem como objetivo disponibilizar moléculas novas a partir do gene Cry11a12 com toxicidade melhorada para tornar as plantas de cana-de-açúcar resistentes à broca gigante da cana-de-açúcar, gerando plantas transgênicas, capazes de expressar toxinas com elevada atividade entomotóxica; disponibilizar δ -endotoxinas melhoradas por processos biotecnológicos; auxiliar para a redução das doses de aplicação de defensivos químicos com redução de custos sociais e ambientais e aumento da produtividade da cultura. São também aspectos da invenção, construções gênicas contendo as moléculas de ácido nucleico, codificantes para Cry11a12 modificado, métodos para a expressão heteróloga das novas moléculas na forma ativa, bem como o uso das mesmas no controle de insetos-praga. A invenção também fornece genes análogos sintéticos os quais são otimizados para transformação e expressão dos mesmos em plantas.

Relatório de Patente de Invenção: “MOLÉCULAS VARIANTES SINTÉTICAS DE TOXINAS CRY1IA12 COM PROPRIEDADES DE CONTROLAR INSETOS-PRAGA, COMPOSIÇÕES CONTENDO TAIS MUTANTES E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DOS MESMOS”.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga, utilizando métodos e composições que compreendem análogos mutantes de δ -endotoxinas. Mais especificamente, a presente invenção tem como objetivo disponibilizar moléculas novas a partir do gene Cry1Ia12 com toxicidade melhorada para tornar as plantas de cana-de-açúcar resistentes à broca gigante da cana-de-açúcar, gerando plantas transgênicas, capazes de expressar toxinas com elevada atividade entomotóxica; disponibilizar δ -endotoxinas melhoradas por processos biotecnológicos; auxiliar para a redução das doses de aplicação de defensivos químicos com redução de custos sociais e ambientais e aumento da produtividade da cultura.

São também aspectos da invenção, construções gênicas contendo as moléculas de ácido nucleico, codificantes para Cry1Ia12 modificado, métodos para a expressão heteróloga das novas moléculas na forma ativa, bem como o uso das mesmas no controle de insetos-praga. A invenção também fornece genes análogos sintéticos os quais são otimizados para transformação e expressão dos mesmos em plantas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A importância da cultura da cana-de-açúcar vem aumentando ao longo dos anos, uma vez que, além de ser utilizada para a produção de açúcar, alimentação animal, energia e fertilizantes, também se apresenta como uma fonte para a produção de combustíveis renováveis, possuindo rápido crescimento e alta produção de energia por hectare (Hartemink, AE (2008) Sugarcane for Bioethanol: Soil and Environmental Issues. *Advances in Agronomy*. 99: 125-182). Para produzir biomassa em atendimento à necessidade energética da humanidade sem competir com a produção de alimentos, deve-se priorizar a produção de plantas fibrosas em vez de amiláceas e oleaginosas (Sticklen, MB (2008) Plant genetic engineering for

biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews*. 9: 433-443). Nesse contexto, plantas fibrosas, como a cultura da cana-de-açúcar, apresentam vantagens, como (i) plantas de alta eficiência energética, (ii) crescimento perene e dossel de longa duração para permitir a colheita durante a maior parte do ano, (iii) possibilidade de aplicação de tecnologia agrícola de produção em grande escala, (iv) serem de fácil e eficiente transformação em formas utilizáveis de energia e (v) de possuírem exploração sustentável econômica e ambientalmente (Matsuoka, S, Bressiani, J, Maccheroni, W, Fouto, I (2010) Bioenergia da Cana. In: Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool – tecnologias e perspectivas. Santos, F, Borém, A, Caldas, C (eds.), 487-517, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG).

Neste sentido o Brasil ocupa posição destacada na produção mundial de etanol a partir da cana-de-açúcar. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2011, http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safra_2010_2011..pdf, acessado em Fevereiro/2012), a previsão do total de cana-de-açúcar a ser moída na safra 2011/2012 é de 571,5 milhões de toneladas em uma área total de aproximadamente oito milhões de hectares. Destes, 47,3% serão destinados à produção de açúcar enquanto que 52,7% à produção de etanol, o que permitirá produzir 22,8 bilhões de litros de álcool. Esses valores colocam o Brasil em primeiro lugar entre os maiores produtores de cana-de-açúcar, seguido por Índia, Tailândia e China (USDA (2010) Sugar: World Production, Supply and Distribution). Os principais fatores que permitiram ao país chegar a esse patamar foram a disponibilidade de terras agricultáveis, um custo total de produção reduzido, a larga experiência nacional, a grande demanda por açúcar e o aumento da necessidade de utilização de fontes de energias limpas e renováveis (Goldemberg, J (2007) Ethanol for a Sustainable Energy Future. *Science*. 315: 808-810). Para aumentar a competitividade do etanol brasileiro no mercado internacional, serão necessários maiores investimentos em infraestrutura, construção de dutos para diminuir custos de

transporte, formação de estoques reguladores e aumento no rendimento das plantas (BNDES (2008) Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável, 316, Rio de Janeiro-RJ). Os fatores abióticos, como os estresses hídrico e salino, e fatores bióticos, como vírus, fungos, nematóides e insetos-praga, sendo esse último de destacada importância, interferem no rendimento das plantas.

Neste contexto, aproximadamente 85 espécies de insetos estão identificadas como causadoras de danos a lavoura canavieira no Brasil, diminuindo a sua produtividade e/ou a qualidade do produto. Dentre estas, algumas são consideradas pragas importantes, em alguns casos com abrangência nacional e em outros, regional (Macedo, N, Macedo, D, Campos, MBS, Novaretti, WRT, Ferraz, LCCB (2010) Manejo de Pragas e Nematóides. In: Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool – tecnologias e perspectivas. Santos, F, Borém, A, Caldas, C (eds.) 119-159, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG).

No cenário brasileiro, um dos principais insetos-praga causadores de danos é a broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus* (Drury 1773; Lepidoptera: Castniidae), um inseto lepidóptero que, no final da fase larval, atinge até 90 mm, apresentando controle bastante difícil devido a inacessibilidade às lagartas que ficam no interior do colmo. As lagartas, quando atacam as plantas de cana-de-açúcar novas, causam os conhecidos “corações-mortos”. Em plantas adultas, ocorre perda de peso, brotação lateral, quebra e atrofiamento de entrenós. A penetração de fungos (*Fusarium moniliforme* e/ou *Colletotrichum falcatum*) nas galerias abertas pelas brocas, muito comum após o ataque das lagartas, ocasiona, por sua vez, a podridão vermelha, que determina a inversão da sacarose, diminuição da pureza do caldo, aumento de gomas e contaminantes, reduzindo o rendimento industrial da cana-de-açúcar (Planalsucar (1977) Guia das principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil, Piracicaba-SP).

A broca gigante da cana-de-açúcar predomina na região Nordeste, especialmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte (Mendonça, AF, Viveiros, AJA, Sampaio, FF (1996) A broca gigante

da cana-de-açúcar, *Castnia licus* Drury, 1770 (Lep. Castniidae). Pragas da cana-de-açúcar, 133-167, Insetos, Cia. Maceió). Este inseto-praga causa, anualmente, prejuízos na ordem de 35 milhões na região Nordeste e, projeta-se, até 400 milhões de reais, por safra, na região Sudeste (Almeida, LC, Dias Filho, MM, Arrigoni, EB (2007) First occurrence of *Telchin licus* (Drury, 1773), the “giant sugarcane borer” in the state of São Paulo, Brazil. *Revista de Agricultura* (Piracicaba). 82: 223-225). Estes dados são alarmantes e requerem medidas para evitar uma perda de competitividade do setor sucroalcooleiro nacional. E uma medida preventiva, seria tornar a cana-de-açúcar resistente a insetos-praga, através de transformação genética com genes de interesse ou por melhoramento genético clássico.

A modificação genética da cana-de-açúcar pode ser uma ferramenta poderosa por introduzir características como resistência a patógenos e a doenças em variedades comerciais de cana-de-açúcar, aumentar seu desempenho agrônomo e obtenção de açúcar (Borém, A, Silva, JÁ, Diola, V (2010) *Biologia Molecular e Biotecnologia*. In: *Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool – tecnologias e perspectivas*. Santos, F, Borém, A, Caldas, C (eds.) 333-353, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG).

Diante do exposto neste documento, a presente invenção tem como objetivo tornar as plantas de cana-de-açúcar resistentes à broca gigante da cana-de-açúcar, gerando plantas transgênicas, capazes de expressar toxinas com elevada atividade entomotóxica, δ -endotoxinas originais e melhoradas por processos biotecnológicos, sanando e/ou minimizando o problema do uso abusivo de inseticidas químicos e suas consequências. As toxinas Cry são descritas como candidatas no controle de insetos-praga (Carlini, CR, Grossi-de-Sa, MF (2002) Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*. 40: 1515-1539; Christou, P, Capell, T, Kohli, A, Gatehouse, JA, Gatehouse, AMR (2006) Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *TRENDS in Plant Science*. 11, 302-308). São amplamente descritas na literatura (Höfte, H, Whiteley, HR (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53: 242-255; Schnepf, HE,

Crickmore, N, Van Rie, J, Lereclus, D, Baum, JR, Feitelson, J, Zeigler, DR, Dean, DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 775-806; Bravo, A, Soberón, M (2008) How to cope with resistance to Bt toxins? *TRENDS in Biotechnology*. 26: 573-579) e especialmente interessantes devido à sua especificidade e por serem inócuas a vertebrados e insetos não alvos. O efeito de culturas Bt em macroorganismos tem sido estudado em experimentos de laboratório e de campo, indicando que as toxinas Cry não são tóxicas a esses organismos (Liu, B, Wang, L, Zeng, Q, Meng, J, Hu, WJ, Li, XG, Zhou, KX, Xu, K, Liu, DD, Zheng, YP (2009) Assessing effects of transgenic Cry1Ac cotton on the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology & Biochemistry*. 41: 1841-1846; Bai, YY, Yan, RH, Ye, GY, Huang, FN, Cheng, JA (2010) Effects of transgenic rice expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein on ground-dwelling collembolan community in postharvest seasons. *Environmental Entomology*. 39: 243-251).

Paralelamente, à importância agronômica da cultura da cana-de-açúcar e dos insetos-praga, tais como a broca gigante da cana-de-açúcar, avanços nas técnicas de biologia molecular e nas técnicas aplicadas na área de biotecnologia permitiram que a recombinação gênica fosse empregada em experimentos de evolução molecular *in vitro* para o desenvolvimento de novas sequências de DNA e moléculas de proteínas (Peng, W, Levine, H, Hwa, T, Kessler, DA (2004) Analytical study of the effect of recombination on evolution via DNA shuffling. *Physical Review E*. 69: 051911). E dentre as técnicas, o embaralhamento de DNA tem sido utilizado para diversos fins, com objetivo de se obter moléculas com características desejadas, como a melhoria da cinética enzimática, geração de novas especificidades para determinados substratos, formação de novos produtos ou modificação de enzimas para desempenho ótimo em ambientes específicos (Lassner, M, Bedbrook, J (2001) Directed molecular evolution in plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 152-156).

A técnica de Embaralhamento de ADN consiste em uma evolução molecular dirigida, a qual gera mudanças pontuais na estrutura primária das moléculas

de ADN por meio de mutações randômicas (Ling Yuan, L. Kurek, I., English, J. and Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 69, No. 3, p. 373 – 392, 2005; Stemmer, W. P. C. Rapid evolution of a protein in vitro By Embaralhamento de ADN. *Nature*. London, Vol. 370, p. 389 – 391, 1994, US5605793, US5811238, US5830721). Os genes de interesse são primeiramente fragmentados de forma aleatória em pequenas sequências de 50-300 pares de base, sendo este produto recombinado em uma reação de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), a qual é conduzida sem adição de oligonucleotídeos. Em uma segunda reação consecutiva, são adicionados os produtos da primeira reação e oligonucleotídeos específicos. Permitindo, desta forma, a amplificação de uma população de genes análogos mutantes/ variantes (Stemmer, W. P. C. Rapid evolution of a protein in vitro by Embaralhamento de ADN. *Nature*. London, Vol. 370, p. 389 – 391, 1994; Zhao, H. and Arnold, F.H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 94, p. 7997 – 8000, 1997).

A eficiência da técnica para produzir moléculas análogas de maior atividade biológica pôde ser comprovada em diversos trabalhos como, por exemplo, em Jager et al (Jager, S. A. W., Jekel, P. A. and Janssen, D. B. Hybrid penicillin acylases with improved properties for synthesis of β -lactam antibiotics. *Enzyme And Microbial Technology*, Vol. 40, p. 1335 – 1344, 2007), onde a atividade enzimática da penicilina aciclase aumentou em 90%. A técnica pode utilizar um único ou mais genes homólogos e seu sucesso dependente de um delicado arranjo entre o tamanho da biblioteca, a diversidade biológica originada e de uma metodologia de seleção das variantes com a característica desejada (Ling Yuan, L. Kurek, I., English, J. and Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 69, No. 3, p. 373 – 392, 2005).

Um exemplo de sucesso na aplicação dessa técnica inclui a toxicidade adquirida da toxina quimérica Cry1Ba/Cry1Db contra *Epiphyas postvittana* (Knight, JS, Broadwell, AH, Grant, WN, Shoemaker, CB (2004) A Strategy for

Shuffling Numerous Bacillus thuringiensis Crystal Protein Domains. Journal of Economic Entomology. 97: 1805-1813). Em outro estudo, uma variação da técnica de DNA shuffling resultou no SPOP ("Shuffled Proteins on Phages") que consiste de ciclos consecutivos de embaralhamento de DNA, seguido de Phage display e seleção funcional (Stoop, AA, Jespers, L, Eldering, E, Pannekoek, H (2000) High-density mutagenesis by combined DNA shuffling and Phage display to assign essential amino acid residues in protein-protein interactions: application to study structure-function of plasminogen activation inhibitor 1 (PAI-I). Journal of Molecular Biology. 301: 1135-1147).

A técnica de Phage display envolve a expressão de proteínas ou peptídeos na superfície de fagos filamentosos, sendo apresentadas como um produto de fusão a uma das proteínas da capa protéica de um bacteriófago (Willats, WGT (2002) Phage display: practicalities and prospects. Plant Molecular Biology. 50: 837-854).

Essa técnica constitui uma das opções para a seleção de proteínas ou peptídeos recombinantes, apresentando êxito para selecionar peptídeos ou proteínas com propriedades específicas de ligação (Smith, GP (1985) Filamentous fusion phage-novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science. 228: 1315-1317) e alterar a afinidade de proteínas por seus ligantes (Neri, D, Petrucci, H, Roncucci, G (1995) Engineering recombinant antibodies for immunotherapy. Cell Biophysics. 27: 47-61). Vários tipos de fagos já foram utilizados na seleção de proteínas Cry: a toxina Cry1Ac foi fusionada na proteína D do capsídeo do fago lambda, (Fernández, LE, Gómez, I, Pacheco, S, Arenas, I, Gill, SS, Bravo, A, Soberón, M (2008) Employing phage display to study the mode of action of Bacillus thuringiensis Cry toxins. Peptides. 29: 324-329).

Diante disso, a presente invenção tem como objetivo solucionar o problema do uso abusivo de inseticidas químicos, bem como aumentar a resistência de plantas, gerando plantas transgênicas, as quais sejam capazes de expressar genes que codificam para moléculas com alta atividade para análogos mutantes de δ -endotoxinas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga, utilizando métodos e composições que compreendem análogos mutantes de δ -endotoxinas. Mais especificamente, a presente invenção tem como objetivo disponibilizar moléculas novas a partir do gene Cry1Ia12 com toxicidade melhorada para tornar as plantas de cana-de-açúcar resistentes à broca gigante da cana-de-açúcar, gerando plantas transgênicas, capazes de expressar toxinas com elevada atividade entomotóxica; disponibilizar δ -endotoxinas melhoradas por processos biotecnológicos; auxiliar para a redução das doses de aplicação de defensivos químicos com redução de custos sociais e ambientais e aumento da produtividade da cultura.

Uma concretização da presente invenção diz respeito a moléculas de ácido nucleico variantes sintéticas de toxinas Cry1Ia12 caracterizadas por compreender:

- a) sequências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6;
- b) complementos das sequências descritas em SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6;
- c) complementos reversos das sequências descritas em SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6;
- d) sequências reversas das sequências descritas em SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6.

Uma segunda concretização da presente invenção diz respeito a uma construção gênica contendo a molécula isolada de ácido nucleico.

Uma terceira concretização da presente invenção diz respeito a um vetor binário caracterizado por conter uma construção gênica. Mais especificamente a presente invenção diz respeito a um vetor binário caracterizado por compreender:

- a. um promotor opcionalmente ligado a uma sequência líder e operacionalmente ligado a
- b. sequência selecionada do grupo identificado como SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6 operacionalmente ligada a

- c. um sinal de terminação;
- d. uma origem de replicação;
- e. um marcador seletivo; e
- f. um sítio de clonagem.

Uma quarta concretização da presente invenção diz respeito a polipeptídeos isolados, caracterizados por compreender sequências substancialmente similares a qualquer uma das sequências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 7-12.

Uma quinta concretização da presente invenção diz respeito a uma célula transformada caracterizada pelo fato de conter uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção; ou um polipeptídeo da presente invenção.

Uma sexta concretização da presente invenção diz respeito a uma planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma caracterizada por compreender uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção; ou um polipeptídeo da presente invenção.

Uma sétima concretização da presente invenção diz respeito a um microorganismo, ou uma parte do mesmo caracterizado por compreender uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção; ou um polipeptídeo da presente invenção.

Uma oitava concretização da presente invenção diz respeito a um método para produzir um organismo geneticamente modificado caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção;
- b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;

c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);

d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo a construção gênica ou vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção.

Uma nona concretização da presente invenção diz respeito a um método para produção de proteína recombinante caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção;

b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;

c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);

d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção;

e. Fazer a extração da proteína recombinante produzida nos organismos selecionados na etapa (d).

Uma décima concretização da presente invenção diz respeito a uma proteína recombinante obtida através do método descrito na presente invenção.

Uma décima primeira concretização da presente invenção diz respeito a uma composição pesticida biodegradável caracterizada por compreender uma concentração eficaz do polipeptídeo isolado ou análogo mutante, em um veículo carreador agronomicamente aceitável.

Uma décima segunda concretização da presente invenção diz respeito a um método para o controle de uma praga caracterizado por compreender as seguintes etapas:

a) detectar a ocorrência da praga em um ambiente;

b) promover o contato da praga com uma proteína pesticida isolada ou com uma composição da invenção, em que a referida proteína consiste das sequências selecionadas do grupo de sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID N° 7-12.

Uma décima terceira concretização da presente invenção diz respeito a um método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) transformar uma cultivar de interesse com uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção;
- b) regenerar linhagens transgênicas contendo a referida construção estavelmente integrada em seus genomas;
- c) selecionar as linhagens transgênicas com os maiores níveis de expressão da δ -endotoxina da invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, mostrando o produto da reação do DNA shuffling para os genes cry1Aa e cry11a12. (A) Marcador de pesos moleculares – 1 Kb Plus Ladder, (B) controle positivo, (C) população de genes cry11a12 recombinados após o DNA shuffling.

Figura 2. Análise de mortalidade das larvas de *T. I. licus* causadas pelas variantes da toxina Cry11a12 em bioensaios utilizando dieta artificial. Controle negativo, somente dieta líquida artificial, Cry11a12 selvagem, proteína original expressa em *E. coli*, Variantes I, II, III, IV e V, variantes da toxina Cry11a12 expressas em *E. coli*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan no nível de 5% de significância.

Figuras 3a e 3b. Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos da toxina Cry11a12 selvagem e suas variantes geradas por embaralhamento de DNA (DNA shuffling), onde foram indicadas as alterações dos resíduos comparando-se com a toxina selvagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção descreve novas moléculas de δ -endotoxinas e métodos, os quais possibilitam a geração de tecnologias capazes de controlar insetos-praga de grande interesse econômico. Mais especificamente, os ácidos nucleicos (genes) da presente invenção, incluindo fragmentos e variantes dos mesmos, compreendem sequências nucleotídicas selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6, as quais codificam proteínas δ -endotoxinas substancialmente similares às sequências identificadas como SEQ ID Nos 7-11. As proteínas δ -endotoxinas descritas são preferencialmente biologicamente ativas contra o inseto-praga pertencente à ordem Lepdóptera: a broca gigante da cana-de-açúcar (*Telchin licus licus*).

A invenção envolve uma estratégia para auxiliar no controle da praga, envolvendo as etapas de produção e seleção de genes novos para serem inseridos em plantas via transgenia, a fim de torná-las resistente a praga alvo. A produção envolve a recombinação e geração de novas moléculas e diz respeito ao produto da aplicação da técnica de DNA shuffling. A seleção diz respeito à aplicação da técnica de Phage display - resulta em escolha de genes de acordo com uma característica desejada. As técnicas utilizadas para produção e seleção de genes novos já estão bem descritas no estado da técnica.

Além das sequências nucleotídicas, a presente invenção também descreve uma construção gênica e um vetor binário compreendendo as sequências gênicas codificadoras de proteínas com alta atividade δ -endotoxinas. O vetor binário é ainda caracterizado por compreender:

- a. um promotor opcionalmente ligado a uma sequência líder e operacionalmente ligado a
- b. sequência selecionada do grupo identificado como SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6 operacionalmente ligada a;
- c. um sinal de terminação;
- d. uma origem de replicação;
- e. um marcador seletivo; e

f. um sítio de clonagem

A presente invenção provê ainda uma célula, planta, microorganismos contendo as moléculas de ácido nucleico e/ou peptídeo da presente invenção.

A presente invenção provê novas técnicas, as quais não dependem do uso dos pesticidas químicos sintéticos tradicionais. A invenção diz respeito a pesticidas biodegradáveis ocorrendo naturalmente e genes codificando os mesmos.

A invenção provê a criação de variantes sintéticas da toxina Cry1Ia12 (SEQ ID N° 1), isolados de *Bacillus thuringiensis*.

A invenção diz respeito também a um método para produzir um organismo geneticamente modificado caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção;
- b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;
- c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);
- d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo a construção gênica ou vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção.

A presente invenção diz respeito ainda a um método para produção de proteína recombinante caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção;
- b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;

- c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);
- d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção;
- e. Fazer a extração da proteína recombinante produzida nos organismos selecionados na etapa (d).

A presente invenção diz respeito também a uma composição pesticida biodegradável caracterizada por compreender uma concentração eficaz do polipeptídeo isolado da presente invenção ou análogo mutante, em um veículo carreador agronomicamente aceitável.

A invenção diz respeito a um método para o controle de uma praga caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) detectar a ocorrência da praga em um ambiente;
- b) promover o contato da praga com uma proteína pesticida isolada ou com uma composição da invenção, em que a referida proteína consiste das sequências selecionadas do grupo de sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID N° 7-12.

A invenção diz respeito também a um método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) transformar uma cultivar de interesse com uma construção gênica ou um vetor binário contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção;
- b) regenerar linhagens transgênicas contendo a referida construção estavelmente integrada em seus genomas;
- c) selecionar as linhagens transgênicas com os maiores níveis de entomotoxicidade da δ -endotoxina.

A construção de bibliotecas de genes análogos variantes, utilizando técnicas de evolução molecular *in vitro*, tem sido empregada nas últimas três décadas. Esse fato se deve ao surgimento de ferramentas biotecnológicas, as quais servem como plataforma de engenharia genética no

desenvolvimento de novas moléculas com atividade melhorada, visando principalmente à agricultura e a indústria farmacêutica (Ling Yuan, L. Kurek, I., English, J. and Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiology and Molecular Biology Review*. Vol. 69, No. 3, p. 373 – 392, 2005). Várias técnicas, incluindo modificações químicas, PCR induzido ao erro e mutagênese sítio dirigida podem ser aplicadas para gerar mutações em uma sequência gênica (Neylon, C. Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution. *Nucleic Acids Research*, vol. 32, N. 4, PP. 1448-1459, 2004). Preferencialmente na presente invenção destaca-se a técnica de Embaralhamento de ADN (Rosic, N. N., Huang, W., Johnston, W. A., James J. Devoss, J. J., Gillam, E. M. J. Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by ADN family shuffling. *Gene*, Vol. 35762, No of Pages 9, 2007; Ling Yuan, L. Kurek, I., English, J. and Keenan, R. Laboratory-directed protein evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 69, No. 3, p. 373 – 392, 2005; Abécassis, V., Pompon, D. and Truan, G. High efficiency family shuffling based on multi-step PCR and in vivo ADN recombination in yeast: statistical analysis of a combinatorial library between human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, No. 20: E 88, 2000; Zhao, H. and Arnold, F.H. Functional and nonfunctional mutations distinguished by random recombination of homologous genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 94, p. 7997 – 8000, 1997; Stemmer, W. P. C. Rapid evolution of a protein in vitro By Embaralhamento de ADN. *Nature*. London, Vol. 370, p. 389 – 391, 1994). A estratégia de Embaralhamento de ADN aplicada na presente invenção apresenta a vantagem de gerar ao mesmo tempo grande diversidade em mutantes contendo mutações produzidas aleatoriamente.

Na presente invenção, foi identificado e clonado um novo gene pertencente à família cry1I, com alta toxicidade a insetos lepidópteros, especificamente a broca gigante da cana-de-açúcar. Os códons desta sequência foram otimizados para sua expressão em plantas, especificamente, para plantas monocotiledôneas. Além disso, foi construída uma biblioteca combinatória,

através da técnica de embaralhamento de DNA, com o intuito de desenvolver genes análogos mutantes, os quais também codificam para a proteína da família Cry1I. Os genes análogos mutantes gerados possuem potencial efeito no controle da broca gigante da cana-de-açúcar.

Para obtenção de genes cry análogos, com alta entomotoxicidade para a broca gigante da cana-de-açúcar, foi utilizado o gene cry1Ia12 (SEQ ID NO 1) isolado da cepa S811 de *B. thuringiensis*. Este gene foi utilizado como substrato no processo de originar genes variantes pela técnica de embaralhamento de DNA. Os variantes foram selecionados quanto à capacidade de se ligarem a receptores presentes na membrana do intestino médio broca gigante da cana-de-açúcar (BBMVs), pela técnica de apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos - Phage display. Para a seleção dos variantes do gene cry1Ia12 da presente invenção utilizamos a técnica de apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos - Phage Display.

Ao final, a toxina nativa Cry1Ia12 e seus análogos mutantes tiveram seus efeitos entomotóxicos avaliados in vitro, por meio de bioensaios seletivos. Para isso, os genes análogos selecionados foram clonados em vetores de expressão heteróloga (*E. coli*) e as toxinas recombinantes geradas utilizadas em bioensaios contra larvas da broca gigante da cana-de-açúcar.

A invenção descreve novas entomotoxinas e métodos, os quais possibilitam a geração de tecnologias capazes de controlar insetos-praga de grande interesse econômico. Mais especificamente, os ácidos nucleicos (genes) da presente invenção, incluindo fragmentos e variantes dos genes cry em questão, compreendem sequências nucleotídicas, as quais codificam proteínas (polipeptídeos) entomotóxicas.

Na descrição que segue, um número de termos são utilizados extensivamente. As seguintes definições são providas para facilitar o entendimento da invenção.

O termo "molécula isolada de ácido nucleico" é utilizado para se referenciar aos ácidos nucleicos da presente invenção. Este termo, quando aplicado para o DNA da presente invenção, refere-se à molécula de DNA que é

originada do gene cry11a12. Por exemplo, a "molécula isolada de ácido nucleico" pode estar inserida em um vetor, tal como um plasmídeo ou um vetor de vírus, ou integrado dentro de um DNA genômico de um procaríoto ou eucarioto. Uma "molécula isolada de ácido nucleico" pode compreender também uma molécula de cDNA. Uma molécula isolada de ácido nucleico inserida em um vetor é também referida às vezes aqui como molécula de ácido nucleico recombinante. O termo "molécula isolada de ácido nucleico" também poderá ser aplicado à moléculas de RNA transcritas de uma molécula de DNA conforme descrita acima.

A definição dos termos "complemento", "complemento reverso" e "sequência reversa" como usados aqui é ilustrada pelo seguinte exemplo: para a sequência 5'AGTGAAGT3', o complemento é 3'TCACTTCA5', o complemento reverso é 3'ACTTCACT5' e a sequência reversa é 5'TGAAGTGA3'.

Como usado aqui, o termo "variante" ou "substancialmente similar" ou ainda "análogo peptídico" ou "análogo mutante" compreende sequências de aminoácidos ou nucleotídeos diferentes de sequências especificamente identificadas, em que um ou mais nucleotídeos ou resíduos de aminoácidos é deletado, substituído ou adicionado e que pode ter sua atividade biológica alterada, auxiliada, aumentada ou diminuída quando comparada com a proteína parental nativa ou não-mutada. As variantes podem ser variantes alélicas, de ocorrência natural, ou variantes de ocorrência não natural. As sequências variantes ou substancialmente similares dizem respeito a fragmentos de ácidos nucleicos ou peptídeos que podem ser caracterizados pela porcentagem de identidade de suas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos com as sequências de nucleotídeo (SEQ ID Nos 2-6) ou de aminoácidos (SEQ ID Nos 8-12) descritas aqui, como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucleicos ou peptídeos preferidos são aqueles cujas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos têm pelo menos cerca de 40 ou 45% de identidade de sequência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de

identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 80% ou 85% de identidade de sequência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a sequência de referência. A identidade percentual é determinada pelo alinhamento de duas sequências a serem comparadas, determinando o número de resíduos idênticos na porção alinhada, dividindo este número pelo número total de resíduos na sequência pesquisada e multiplicando o resultado por 100. Esse alinhamento pode ser feito através de ferramentas de domínio público, como BLASTN e BLASTP, disponíveis na página do Centro Nacional para Informação Biotecnológica/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento de sequência e o cálculo de porcentagem de identidade da presente invenção foram realizados conforme descrito com as sequências depositadas no Banco de Genes. O termo “análogos sintéticos” como citado nesta invenção diz respeito a modificação das sequências nucleotídicas dos variantes selecionados. Modificações em substituições de bases nucleotídicas apropriando ao códon preferencial de bases, próprio da planta utilizada na transformação genética. A nova sequência é obtida por síntese química e as substituições nos nucleotídeos não representam alterações na sequência traduzida de aminoácidos.

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

Uma “construção gênica” é um gene compreendendo um promotor e uma região codificadora de diferentes origens. No caso da presente invenção, a construção gênica compreende os polinucleotídeos da presente invenção ligados de forma associada ou isoladamente à regiões reguladoras da expressão, como promotores e sinais de terminação.

A obtenção de construções gênicas compreendendo promotores ligados a ácidos nucleicos é conhecida no estado da técnica e pode ser encontrada em Sambrook, et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

O termo “vetor” diz respeito a um replicon, como plasmídeo, fago ou vírus, no qual outras sequências genéticas ou elementos (sejam eles de ADN ou RNA) podem ser ligados. Desta forma, os genes podem ser replicados juntamente com o vetor. Preferencialmente um dos vetores de interesse da presente invenção diz respeito ao fagomídeo. O termo “fagomídeo” diz respeito a um vetor que contém sequência para replicação em fago e em bactéria, este vetor tem características que atendem as especificações da célula hospedeira bem como agentes selecionadores e promotores. Um exemplo é o fagomídeo pComb3X (Andris-Widhopf, J.; Rader, C.; Steinberger, P.; Fuller, R., Barbas III, C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. Journal of Immunological Methods, 242: 159-181, 2000), que tem como característica fusionar a gene de interesse ao gene da proteína III, do bacteriófago filamentososo M13, localizada no capsídeo viral. O termo “vetor recombinante” é resultante da combinação de um vetor comercial com genes da presente invenção operacionalmente ligado a um polinucleotídeo endógeno e/ou heterólogo de interesse que por sua vez está operacionalmente ligado a um sinal de terminação. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.). Alguns exemplos de vetores utilizados na presente invenção, mas não limitados, são os vetores pGEM-T easy (Promega Corporation), pCambia 2300 (Canberra, Austrália), pComb3X

(Andris-Widhopf, J.; Rader, C.; Steinberger, P.; Fuller, R., Barbas III, C. F. Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. *Journal of Immunological Methods*, 242: 159-181, 2000), pAHC17 e pAHC20 (Christensen, A. H. & Quail, P. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, 5: 213-218, 1996). A obtenção de vetores recombinantes compreendendo promotores ligados a ácidos nucleicos é conhecida no estado da técnica e pode ser encontrada em Sambrook et al. (Sambrook, J., Russell, D. W., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989).

Um “vetor binário” é um vetor derivado de plasmídios capazes de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*. Preferencialmente para a presente invenção foram utilizados os vetores binários: pPKb002 e pPKb003 (Himmelbach, A.; Zierold, U.; Hensel, G.; Riechen, J.; Douchkov, D.; Schweizer, P.; Kumlehn, J. A Set of Modular Binary Vectors for Transformation of Cereals. *Breakthrough Technologies*, 145: 1192-1200, 2000), além do vetor p7iU® (DNA Cloning Service e. K.). Um vetor de transformação de plantas baseado no sistema *Agrobacterium* do tipo binário deve conter uma origem de replicação apropriada e um gene de seleção em bactéria, geralmente resistência a um antibiótico. Além disso, é desejável que ele contenha uma região de múltiplos sítios de clonagem (contendo sequências de enzimas de restrição) entre as extremidades do T-DNA, para a inserção das sequências gênicas desejadas, e uma região de transferência (*ori I*) e sítio de ativação para conjugação. Uma vez obtido o vetor binário com a sequência desejada do gene, operacionalmente ligado, ele deve ser transferido para *Agrobacterium*. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.) ou adquiridos por doação pública (série pCambia, Canberra, Austrália). O termo “operacionalmente ligado” significa que as sequências regulatórias

necessárias para expressão da sequência codificante são colocadas na molécula de ADN em posições apropriadas relativas à sequência codificante para efeito de sua expressão. Essa mesma definição é às vezes aplicada para o arranjo de sequências codificantes e elementos controladores da transcrição (por exemplo, promotores, acentuadores ou “enhancers” e elementos de terminação) no vetor binário. Uma região codificante exógena é tipicamente flanqueada por regiões regulatórias operacionalmente ligadas que regulam a expressão da região codificante exógena em uma célula transformada (podendo ser microrganismo, vegetal ou animal). Uma região regulatória típica operacionalmente ligada a uma região codificante exógena inclui um promotor, isto é, um fragmento de ácido nucleico que pode causar transcrição de regiões codificantes exógenas, posicionado na região 5' da região codificante exógena.

O termo “operacionalmente ligado” significa que as sequências regulatórias necessárias para expressão da sequência codificante são colocadas na molécula de DNA em posições apropriadas relativas à sequência codificante para efeito de sua expressão. Essa mesma definição é às vezes aplicada para o arranjo de sequências codificantes e elementos controladores da transcrição (por exemplo, promotores, acentuadores ou “enhancers” e elementos de terminação) no vetor binário. Uma região codificante exógena é tipicamente flanqueada por regiões regulatórias operacionalmente ligadas que regulam a expressão da região codificante exógena em uma célula transformada (podendo ser microrganismo, vegetal ou animal). Uma região regulatória típica operacionalmente ligada a uma região codificante exógena inclui um promotor, isto é, um fragmento de ácido nucleico que pode causar transcrição de regiões codificantes exógenas, posicionado na região 5' da região codificante exógena. A presente invenção não está limitada para o uso de qualquer promotor em particular e uma ampla variedade de promotores são conhecidos no estado da técnica. Os promotores podem ser, mas não estão limitados a, induzíveis, constitutivos e tecido-específicos.

Em um dos aspectos da invenção, o promotor é um promotor constitutivo. Em outro aspecto da invenção, a atividade do promotor é estimulada por

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

O promotor pode conter elementos “enhancers”. Um “enhancer” é uma sequência de DNA que pode estimular a atividade do promotor. Ela pode ser um elemento inato do promotor ou um elemento heterólogo inserido para aumentar o nível e/ou a tecido-especificidade de um promotor. “Promotores constitutivos” referem-se àqueles que dirigem a expressão gênica em todos os tecidos e durante todo tempo. Promotores “tecido-específicos” ou “desenvolvimento-específicos” são aqueles que dirigem a expressão gênica quase que exclusivamente em tecidos específicos, tais como folhas, raízes, caules, flores, frutos ou sementes, ou em estágios do desenvolvimento específicos em um tecido, como no início ou final da embriogênese.

Em um dos aspectos da invenção, o promotor é um promotor expresso em plantas. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em plantas” significa uma sequência de ADN que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de planta. Isso inclui qualquer promotor de origem vegetal; qualquer promotor de origem não vegetal que seja capaz de direcionar a síntese do gene presente no T-ADN de *Agrobacterium*; promotores tecido-específicos ou órgão-específicos, incluindo mas não limitados a promotores semente-específicos (WO8903887), promotores específicos de órgãos primordiais (como mencionado no pedido de patente US20030175783, An, Y. Q., Huang, S., McDowell, J. M., McKinney, E. C., Meagher, R. B., Conserved expression of the Arabidopsis ACT1 and ACT3 actin subclass in organ primordia and mature pollen. *The Plant Cell* 8, 15-30, 1996), promotores específicos de caule (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller, B., Sauer, N., Lamb, C. J., Glycine-rich cell wall proteins in bean: Gene structure and association of the protein with the vascular system. *EMBO J.* 7: 3625-3633, 1988), promotores específicos de folhas (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hudspeth,

R. L., Grula, J. W., Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C4 photosynthesis. *Plant Mol Biol* 12:579-589, 1989), promotores específicos de mesófilo, promotores específicos de raiz (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller, B., Lamb, C. J., Specific expression of a novel cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. *Genes Devel.* 3:1639-1646, 1989), promotores específicos de tubérculos (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keil, M., Sánchez-Serrano, J. J., Willmitzer, L., Both wound-inducible and tuber-specific expression are mediated by the promoter of a single member of the potato proteinase inhibitor II gene family. *EMBO J.* 8: 1323:1330, 1989), promotores específicos de tecidos vasculares (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Peleman J., Saito, K., Cottyn, B., Engler, G., Seurinck, J., Van Montagu, M., Inze, D., Structure and expression analyses of the S-adenosylmethionine synthetase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 84: 359-369, 1989), promotores específicos de estames (WO8910396, WO9213956), promotores específicos da zona de deiscência (WO9713865); e semelhantes. Preferencialmente, o promotor da presente invenção é escolhido do grupo dos promotores, podendo ser, mas não estando limitado a Ubi1 (*Zea mays*) (Christensen, A. H., Sharrock, R. A., Quail, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689, Christensen, A. H. & Quail, P. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, 5: 213-218, 1996), Ubi9 (*Saccharum officinarum*) (Wei, H., Wang, M., Moore, P. H., Albert, H. H. Comparative expression analysis of two sugarcane polyubiquitin promoters and flanking sequences in transgenic plants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1241-1251, 2003) e Act1 (*Oryza sativa*) (McElroy, D., Blowers, A. D., Jenes, B., Wu, R. Construction of expression vectors based on rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics*, 231: 150-160, 1991).

Como usado aqui, o termo “promotor expresso em bactérias” significa uma sequência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula bacteriana. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em fungos” significa uma sequência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de fungo. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em insetos” significa uma sequência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de inseto.

Uma “sequência líder” ou “sequência sinal” na presente invenção significa uma sequência de ácido nucleico que, quando operacionalmente ligada a uma molécula de ácido nucleico, permite a secreção do produto da molécula de ácido nucleico. A sequência líder está preferencialmente localizada na região 5' da molécula de ácido nucleico. Preferencialmente, a sequência líder é obtida do mesmo gene que o promotor utilizado para dirigir a transcrição da molécula de ácido nucleico, ou é obtida do gene onde a molécula de ácido nucleico é derivada. Preferencialmente a presente invenção utiliza a sequência sinal proveniente de uma cultivar de cana-de-açúcar.

O sinal de terminação da transcrição e a região de poliadenilação da presente invenção inclui, mas não está limitado a, sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), sinal de terminação do gene da octopina sintetase, sinal de terminação do gene 19S e 35S do CaMV, sinal de terminação do gene da álcool desidrogenase de milho, sinal de terminação do gene da manopina sintetase, sinal de terminação do gene da beta-faseolina, sinal de terminação do gene da ssRUBISCO, sinal de terminação do gene da sucrose sintetase, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*, e outros semelhantes.

Conforme descrito anteriormente, a expressão “vetores binários” pode compreender um promotor induzível operacionalmente ligado a uma sequência de ácido nucleico codificando a proteína inseticida da presente invenção. Promotores “induzíveis” podem dirigir a expressão de um

polinucleotídeo com o qual eles estejam operacionalmente ligados, em um tecido ou estágio específico do desenvolvimento ou respondendo a condições ambientais. Em um dos aspectos da invenção, vetores de expressão compreendem um promotor induzível firmemente regulado operacionalmente ligado à uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína inseticida. Tal vetor binário pode adicionalmente compreender um gene marcador de seleção (por exemplo, um gene codificando uma proteína que confere resistência a antibiótico) operacionalmente ligado a um promotor constitutivo ou a um promotor induzível firmemente regulado. Dependendo da aplicação, ele pode beneficiar a expressão da sequência de ácido nucleico codificando uma proteína inseticida através de um promotor induzível de inseto-praga. Em um aspecto da presente invenção pode ser vantajoso utilizar promotores que são expressos localmente ou próximo do sítio de infecção da praga.

O termo “marcador seletivo” é referido aqui como sendo sequências que conferem resistência a antibióticos ou serem marcadores visuais. Preferencialmente os marcadores podem ser selecionados do grupo de, mas não estando limitado a, sequências codificadoras dos genes canamicina, neomicina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, higromicina, geneticina, fosfotricina, glifosato, glufosinato de amônio, AHAS, BAR e GUS. Organismos (plantas ou bactérias) sobreviventes ao gene marcador (ou gene de resistência) em meio de cultivo ou em aplicações tópicas são indicados como transformantes positivos caracterizados pela presença de gene exógeno integrado ao genoma desse organismo.

O termo “oligonucleotídeo” é referido aqui como ‘primers’ e ‘sondas’ da presente invenção, e é definido como uma molécula de ácido nucleico compreendendo de dez a noventa deoxiribonucleotídeos, preferencialmente mais do que oito. O tamanho exato dos oligonucleotídeos é dependente dos fatores experimentais particulares de cada etapa do processo.

Conforme usado na presente invenção, os termos “codificador”, “codificando” ou “codificado” quando usados no contexto de uma sequência nucleotídica específica significa a mesma possui uma informação, a qual será traduzida

biologicamente da sequência de nucleotídeo para uma sequência proteica específica. A informação pela qual uma proteína é codificada é especificada pelo uso de códons. Estes códons são explorados por cada organismo vivo de maneira diferenciada podendo partes de sequências nucleotídicas distintas serem traduzidas biologicamente em codons idênticos.

O termo "gene" corresponde a uma sequência nucleotídica específica localizada em uma região em particular do cromossomo, sendo responsável por codificar um produto final específico. O gene também carrega em sua estrutura primária toda a informação necessária para os processos de transcrição e tradução biológica, como por exemplo, regiões promotoras e reguladoras da transcrição. No caso da presente invenção, gene compreende as sequências nucleotídicas codificadoras correspondente ao gene cry1la12 e aos seus análogos.

Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados de forma interrelacionados para referir a um polímero de resíduos de aminoácidos. Os termos aplicam-se para polímeros de aminoácidos onde um ou mais resíduo de aminoácido é um análogo químico artificial de um aminoácido correspondente ocorrendo naturalmente, bem como para polímeros de aminoácidos ocorrendo naturalmente.

Polipeptídeos da invenção podem ser produzidos ou através de um ácido nucleico descrito aqui, ou pelo uso de técnicas padrões de biologia molecular. Por exemplo, uma proteína truncada da invenção pode ser produzida pela expressão de um ácido nucleico recombinante da invenção em uma célula hospedeira apropriada, ou alternativamente pela combinação de procedimentos, tais como digestão utilizando protease e purificação.

Na presente invenção os polipeptídeos isolados são caracterizados por compreender sequências substancialmente similares a qualquer uma das sequências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 7-11 e exibirem atividade inseticida, quando administrado oralmente, a larvas de insetos susceptíveis. Os polipeptídeos da presente invenção são caracterizados por exibir atividade inseticida, quando fornecido em uma dieta administrada oralmente a uma larva de inseto lepidóptero, mais

especificamente a larva de broca gigante da cana-de-açúcar. Mais especificamente, os polipeptídeos isolados da presente invenção são caracterizados por ser uma δ -endotoxina.

Na presente invenção o termo “proteína recombinante” se refere às moléculas quiméricas obtidas a partir da aplicação da técnica de embaralhamento do DNA de genes (codificadores de Cry11a12). Podendo ser essas moléculas expressadas, mas não somente, em fagos, bactérias leveduras e plantas. Preferencialmente, a proteína recombinante da presente invenção é caracterizada por ter atividade δ -endotoxina.

O termo “substancialmente pura” refere-se a preparações compreendendo pelo menos 50-60% de peso do componente de interesse (por exemplo, ácido nucleico, oligonucleotídeo, polipeptídeo, proteína, etc). Mais preferencialmente, a preparação compreende pelo menos 75% de peso, e mais preferencialmente 90-99% de peso do componente de interesse. A pureza é medida por meio de métodos apropriados para o componente de interesse (por exemplo, espectrometria de massa e similares).

O termo “gene isolado” é utilizado na presente invenção. Este termo refere-se à sequência nucleotídica existente em determinado genoma.

O termo “proteína isolada” ou “proteína isolada e purificada” é, às vezes, utilizado na presente invenção. Este termo refere-se a uma proteína produzida pela expressão de uma molécula de ácido nucleico isolada da presente invenção. Alternativamente, este termo pode referir-se a uma proteína que tem sido suficientemente separada de outras proteínas que ela poderia estar naturalmente associada, tal como ela existe na sua forma “substancialmente pura”. O termo “isolado” não exclui misturas sintéticas ou artificiais com outros compostos ou materiais, ou a presença de impurezas que não interferem com a atividade fundamental da proteína, e que pode estar presente, por exemplo, em uma purificação incompleta, adição de estabilizadores, ou combinados dentro, por exemplo, em uma composição agriculturalmente aceitável.

O termo “atividade biológica” diz respeito a uma função ou um grupo de funções executado por uma molécula em um contexto biológico (isto é, em

um organismo ou substituto in vitro ou algum outro modelo similar). Para uma δ -endotoxina, a atividade biológica é caracterizada pela sua atividade citotóxica aos receptores presentes no intestino médio do inseto-praga alvo, ocasionando à morte do mesmo.

Como usado aqui, o termo “impactando insetos-praga” refere-se ao efeito de mudar nos insetos a alimentação, crescimento, e/ou comportamento em qualquer estágio do desenvolvimento, incluindo, mas não limitado a: matar o inseto; retardar o crescimento; impedir capacidade reprodutiva; atividade anti-alimentação; e outros semelhantes.

Os termos “atividade pesticida” e “atividade inseticida” são utilizados sinonimamente para referir-se a atividade de um organismo ou uma substância (p.ex: uma proteína) que pode ser medida por, mas não estando limitada a mortalidade da praga, perda de peso da praga, repelência à pragas, e outros comportamentos e mudanças físicas de uma praga depois da alimentação e exposição por um apropriado período de tempo. Dessa forma, o impacto da atividade pesticida deve ter pelo menos um parâmetro mensurável de aptidão da praga. Por exemplo, “proteínas pesticidas e/ou inseticidas” são proteínas que desencadeiam a atividade pesticida por elas mesmas ou em combinação com outras proteínas. δ -endotoxinas são proteínas pesticidas. Outros exemplos de proteínas pesticidas incluem, por exemplo, jaburetox, inibidores de alfa-amilase, dentre outros.

O termo “quantidade efetiva de pesticida” diz respeito a uma quantidade de uma substância ou organismo que tem atividade pesticida quando presente no ambiente da praga. Para cada substância ou organismo, a quantidade efetiva de pesticida é determinada empiricamente para cada praga afetada em um ambiente específico. Similarmente o termo “quantidade efetiva de pesticida” pode ser usado para referir a uma “quantidade efetiva de pesticida” quando uma praga é um inseto-praga. O termo “composição pesticida biodegradável” é caracterizado por ser produtos ou substâncias liberadas no solo para ação em ambiente de praga, podendo ser degradados por ação de microorganismos, fotólise, oxidação, entre outros, em um período curto de tempo. As composições biodegradáveis envolvem

substâncias classificadas como organofosforados, carbamatos, triazinas, anilinas, podem ser colocadas na forma de estacas que podem ser introduzidas no solo sem danos permanentes. Os produtos geralmente compreendem um aglutinante polimérico sólido, hidrófilo, solúvel em água, a um pesticida sistêmico. Ainda, o pesticida biodegradável se caracteriza pelo fato de que um veículo carreador aceitável pode ser um agente superfície-ativo, um veículo carreador inerte, um preservativo, um umectante, um estimulante de alimentação, um atrativo, um agente encapsulante, um ligante, um emulsificador, um corante, um protetor uv (ultra-violeta), um tampão, um agente de fluxo ou fertilizante, doadores de micronutriente, ou outras preparações que influenciam o crescimento da planta. A composição pesticida biodegradável é caracterizada pelo fato de o veículo carreador aceitável ser um microorganismo transformado. Na presente invenção a composição pesticida biodegradável é caracterizada pelo fato de o polipeptídeo da presente invenção ou análogo mutante ser usado em combinação com outras proteínas inseticidas.

O termo “recombinantemente engenheirado” ou “engenheirado” diz respeito a utilização da tecnologia do ADN recombinante para gerar (engenheirar) uma mudança na estrutura da proteína baseando-se no entendimento do mecanismo de ação da mesma, podendo os aminoácidos serem introduzidos, deletados ou substituídos.

O termo “Embaralhamento de ADN” é utilizado para descrever um método empregado em evolução molecular dirigida in vitro para gerar variantes de uma única sequência gênica, ou duas ou mais sequências gênicas homólogas por meio de recombinações de fragmentos gerados aleatoriamente, com recuperação de sequências modificadas e com consequente modificação de resíduos de aminoácidos na proteína codificada pelo análogo mutante.

O termo “apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos - Phage display” diz respeito a um sistema de expressão e de interações de proteínas fusionadas a bacteriófagos que permitem uma varredura em células, tecidos ou órgãos a procura de pares receptor-ligantes, sendo esses

ligantes, proteínas que se ligam aos receptores presentes no alvo em estudo.

Como usado aqui, o termo “sequência de nucleotídeo mutada” ou “mutação” ou “sequência de nucleotídeo mutageneizada” diz respeito a uma sequência de nucleotídeo que tem sido mutada ou alterada para conter um ou mais resíduos de nucleotídeos (p.ex.: pares de base) que não está presente no tipo selvagem ou na sequência não-mutada. Tal mutagênese ou alteração consiste de uma ou mais adições, deleções, ou substituições ou realocamento de resíduos de ácidos nucleicos.

Como usado aqui, o termo “melhora da atividade inseticida” ou “melhora da atividade pesticida” caracteriza um polipeptídeo ou uma δ -endotoxina da invenção que possui a atividade pesticida contra lepidópteros melhorada em relação às δ -endotoxinas originais que não sejam efetivos contra insetos. Para medir a melhora da atividade pesticida ou inseticida deve-se requerer uma demonstração de alteração do desenvolvimento (tamanho e peso) das larvas do inseto-específico ou da mortalidade das larvas após o contato com a δ -endotoxina da invenção.

Um especialista no assunto tem conhecimento dos avanços no campo da biologia molecular tais como uma mutagênese sítio-específica ou ao acaso, metodologia da reação de polimerase em cadeia (PCR), e técnicas da engenharia protéica provém uma extensiva coleção de ferramentas e protocolos viáveis para o uso para alterar ou engenheirar ambas as sequências de aminoácido e sequências genéticas disfarçadas de proteínas de interesse agrícola. Então, as proteínas pesticidas da invenção podem ser alteradas de várias maneiras, incluindo substituição de aminoácido, deleções, trunicações, e inserções. Métodos para tais manipulações são geralmente conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, uma sequência de aminoácido variante da proteína pesticida da presente invenção pode ser preparada pela introdução de mutações dentro de um ácido nucleico sintético (p.ex.: molécula de ADN). Métodos para mutagênese e alterações em ácidos nucleicos são bem descritos no estado da técnica.

Entende-se que os polipeptídeos da invenção podem ser produzidos tanto pela expressão de um ácido nucleico descrito aqui, ou pelo uso de técnicas padrões de biologia molecular.

Descreve-se que um método para o controle de uma praga pode ser caracterizado por compreender as seguintes etapas: a) detectar a ocorrência da praga em um ambiente; b) promover o contato da praga com uma proteína pesticida isolada ou produzida como uma composição da presente invenção.

Sabe-se que proteínas pesticidas podem ser oligoméricas e variam em peso molecular, número de resíduos, componentes peptídicos, atividades contra pragas particulares, e outras características. No entanto, pelos métodos descritos aqui, proteínas ativas contra uma variedade de pragas podem ser isoladas e caracterizadas. As proteínas pesticidas da invenção podem ser usadas em combinação ou outras proteínas inseticidas para aumentar a ação no inseto alvo. Além do mais, o uso de proteínas pesticidas da presente invenção em combinação com outros princípios inseticidas de uma natureza diferente podem ter uma utilidade particular para prevenção e/ou manejo da resistência à inseto. Outros princípios inseticidas incluem, mas não estão limitados a outros tipos de inibidores de protease (ambos serina e cisteína), lectinas, e peroxidases.

A invenção também diz respeito a plantas transformadas com pelo menos um ácido nucleico da presente invenção, com um gene quimérico compreendendo o ácido nucleico, ou com um vetor binário compreendendo o gene quimérico. Preferencialmente, o microrganismo é um que se multiplica em plantas. Mais preferencialmente, o microrganismo é uma bactéria colonizadora de raiz. Uma concretização da presente invenção diz respeito a uma proteína pesticida encapsulada, que compreende um microrganismo transformado compreendendo pelo menos uma proteína pesticida da invenção.

A invenção também provê um método de aumentar o alcance do inseto alvo através do uso de proteínas pesticidas da invenção em combinação com pelo menos uma segunda proteína pesticida que seja diferente da proteína

pesticida da invenção. Qualquer proteína pesticida conhecida no estado da técnica pode ser utilizada no método da presente invenção. Tais proteínas pesticidas incluem, mas não estão limitadas a δ -endotoxinas de Bt, inibidores de protease, lectinas, alfa amilases, hidrolases acil lipídicas, e peroxidases.

A invenção também compreende plantas transgênicas ou transformadas compreendendo pelo menos uma sequência nucleotídica da invenção. Preferencialmente, a planta é estavelmente transformada com um gene quimérico, compreendendo pelo menos uma sequência nucleotídica da invenção operacionalmente ligada a um promotor que dirige a expressão em células vegetais. Como usado aqui, o termo “plantas transgênicas” ou “plantas transformadas” refere-se a uma planta que compreende dentro de seu genoma um polinucleotídeo heterólogo. Geralmente, o polinucleotídeo heterólogo é integrado ao genoma de uma planta transgênica, de forma estável para que o polinucleotídeo seja passado para gerações sucessivas. O polinucleotídeo heterólogo pode ser integrado dentro do genoma sozinho ou como parte de um vetor recombinante.

Como usado aqui, o termo “transgênico” inclui qualquer célula, linhagem celular, calos, tecidos, parte da planta, ou genótipo da planta que tem sido alterado pela presença do ácido nucleico heterólogo incluindo aqueles transgênicos inicialmente alterados bem como aqueles criados por cruzamento sexual ou propagação sexual do transgênico sexual.

O termo “plantas” refere-se a organismos fotossintéticos, ambos eucariotos e procariotos, onde o termo “plantas desenvolvidas” refere-se a plantas eucariotas. O termo refere-se a plantas inteiras, órgãos vegetais (p.ex.: folhas, caules, raízes, flores, entre outros), sementes, células vegetais, e progênies dos mesmos. Partes das plantas transgênicas também estão incluídas dentro do escopo da invenção compreendendo, por exemplo, células vegetais, protoplastos, tecidos, calos, embriões, bem como flores, óvulos, caules, frutos, folhas, raízes originados de plantas transgênicas ou sua progênie previamente transformada com uma molécula de ADN da invenção e, portanto, consistindo de pelo menos parte das células

transgênicas, são também objeto da presente invenção. Os ácidos nucleicos da invenção podem ser utilizados para conferir tratos desejados em essencialmente qualquer planta. Então, a invenção possui uso sobre várias espécies de plantas, incluindo espécies dos gêneros Anona, Arachis, Artocarpus, Asparagus, Atropa, Avena, Brassica, Carica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Carthamus, Cocos, Coffea, Cucumis, Cucurbita, Daucus, Elaeis, Fragaria, Glycine, Gossypium, Helianthus, Heterocallis, Hordeum, Hyoseyamus, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Malus, Manihot, Majorana, Medicago, Nicotiana, Olea, Oryza, Panieum, Pannesetum, Passiflora, Persea, Phaseolus, Pistachia, Pisum, Pyrus, Prunus, Psidium, Raphanus, Ricinus, Secale, Senecio, Sinapis, Solanum, Sorghum, Theobromus, Trigonella, Triticum, Vicia, Vitis, Vigna, e Zea. Particularmente, a presente invenção diz respeito a plantas de cana-de-açúcar transformadas com as sequências nucleotídicas da presente invenção bem como fragmentos e derivados das mesmas.

Protocolos de transformação bem como protocolos para introduzir sequências de nucleotídeos dentro de plantas podem variar dependendo do tipo de planta ou de célula vegetal, por exemplo, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, alvos da transformação. Métodos viáveis de introduzir sequências nucleotídicas em células vegetais e a subsequente inserção dentro do genoma vegetal são bem descritos no estado da técnica e podem ser, mas não estão limitados a técnicas tais como eletroporação e microinjeção de protoplastos de células de plantas, ou a construção pode ser introduzida diretamente no tecido vegetal utilizando-se métodos balísticos, tais como bombardeamento de partículas recobertas com ADN.

Técnicas de microinjeção são conhecidas no estado da técnica e bem descritas em literatura científica e patentária (Zhou, G., Wang, J., Zeng, Y., Huang, J., Qian, S., Liu, G., Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. Meth. in Enzymol., 101, 433-448, 1983) (como mencionado no pedido de patente US4743548). A introdução de construções gênicas utilizando-se precipitações de polietileno glicol é descrita em Paszkowski et al. (Paszkowski, J., Shillito, R. D., Saul, M., Mandák, V., Hohn, T. Hohn, B.,

Potrykus, I., Direct gene transfer to plants. *Embo J.* 3: 2717-2722, 1984) (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de eletroporação são descritas em Fromm et al (Fromm, M. E., Taylor, L. P. Walbot, V., Expression of genes electroporated into monocot and dicot plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824, 1985) (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de transformações balísticas são descritas em Klein et al. (Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., Sanford, J. C., High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73, 1987) (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

Alternativamente, as construções gênicas podem ser combinadas com regiões flanqueadoras de T-ADN apropriadas e introduzidas em um vetor convencional, o hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens*. A função de virulência do hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens* direcionará a inserção das construções gênicas e marcador adjacente dentro do ADN da célula vegetal quando a célula é infectada pela bactéria. Técnicas de transformação mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluindo desarmamento e o uso de vetores binários, são bem descritas na literatura científica (como mencionado no pedido de patente US 20020152501, Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A., Hoffmann, N. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 233:496-498, 1984; e Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L., Woo, S. C. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803, 1983).

Células de plantas transformadas derivadas de qualquer uma das técnicas de transformação descritas acima podem ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado e então o fenótipo desejado, tal como resistência a insetos. Tais técnicas de regeneração contam com a manipulação de certos fitohormônios em meio de crescimento de cultura de tecidos, tipicamente contendo um marcador biocida e/ou herbicida, que deve ser introduzido junto com a sequência de nucleotídeos

desejada. Regeneração de plantas a partir de cultura de protoplastos é descrita em Evans et al (Evans, D. E., and Bravo, J. E., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, vol. 1, 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983); e Binding 1985 (Binding, H., Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985) (como mencionado no pedido de patente US20020152501). A regeneração pode ser também obtida através de calos de planta, explantes, órgãos, ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são descritas geralmente em Klee et al (Klee, H., Horsch, R., Rogers, S., Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Ann. Ver. Of Plant Phys. 38:467-486, 1987 (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

Um gene codificando uma proteína pesticida da invenção pode ser introduzido por meio de um vetor viável dentro de um hospedeiro microbiano, e o dito hospedeiro pode ser inserido em plantas ou em animais. O termo "introduzido" no contexto de inserir um ácido nucleico dentro de uma célula significa "transfecção" ou "transformação" ou "transdução" e inclui a incorporação de um ácido nucleico dentro de uma célula procariótica ou eucariótica onde o ácido nucleico pode ser incorporado dentro do genoma da célula (p.ex.: cromossomo, plasmídeo, plastídeo, ou ADN mitocondrial), convertido dentro de um replicon autônomo, ou expresso transientemente (p.ex.: ARNm transfetado).

O termo "microorganismo" é definido aqui como sendo micróbios que possuem organelas funcionais no interior de suas cápsulas ou células como bactérias, protozoários, fungos unicelulares e algas unicelulares.

Existem vários métodos viáveis para introduzir um gene expressando a proteína pesticida dentro de um microorganismo hospedeiro sob condições que permitam a manutenção e a expressão estável do gene. Por exemplo, vetores de expressão podem ser construídos contendo a sequência nucleotídica de interesse operacionalmente ligada a sinais regulatórios de transcrição e tradução para expressão da sequência de nucleotídeo. Quando uma sequência de nucleotídeo homóloga interna do organismo se encontra

com a sequência no vetor binário, poderá haver uma recombinação entre elas e o gene que codifica a proteína pesticida se integrará no genoma do organismo hospedeiro de forma estável.

Células hospedeiras viáveis, onde as células contendo a proteína inseticida serão tratadas para prolongar a atividade da proteína inseticida na célula quando a célula tratada for aplicada no meio ambiente da praga alvo, pode incluir procaríotos ou eucaríotos, normalmente sendo limitadas àquelas células que não produzem substâncias tóxicas em organismos superiores. No entanto, organismos que produzem substâncias tóxicas em organismos superiores podem ser usados, onde a toxina for instável ou o nível de aplicação suficientemente baixo para evitar qualquer possibilidade de toxicidade a hospedeiros mamíferos. Particularmente os hospedeiros são procaríotas e eucaríotas menos desenvolvidos como os fungos. Exemplos de procaríotos, ambos gram negativos e gram positivos, incluem, mas não estão limitados a Enterobacteriaceae, tais como Escherichia, Erwinia, Shigella, Salmonella, e Proteus; Bacillaceae; Rhizobiceae, tais como Rhizobium; Spirillaceae, tais como Photobacterium, Zymomonas, Serratia, Aeromonas, Vibrio, Desulfovibrio, Spirillum; Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae, tais como Pseudomonas e Acetobacter; Azotobacteraceae e Nitrobacteraceae. Entre os eucaríotos podem ser exemplificados os fungos, tais como Phycomycetes e Ascomycetes, os quais incluem leveduras, tais como Saccharomyces e Schizosaccharomyces; e Basidiomycetes, tais como Rhodotorula, Aureobasidium, Sporobolomyces, e semelhantes.

Características de interesse particular na seleção de uma célula hospedeira para o propósito de produzir a proteína inseticida incluem a facilidade de introdução do gene da proteína inseticida dentro do sistema de expressão, eficiência de expressão, estabilidade da proteína no hospedeiro, e a presença de capacidades genéticas auxiliares.

Organismos hospedeiros de particular interesse incluem leveduras, tais como Rhodotorula spp., Aureobasidium spp., Saccharomyces spp., e

Sporobolomyces spp., *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, e outros semelhantes.

As concretizações da presente invenção podem ser efetivas contra uma variedade de pragas. Para os propósitos da presente invenção, as pragas incluem, mas não estão limitadas a, insetos, fungos, bactérias, nematóides, ácaros, patógenos protozoários, parasitas animais, e semelhantes. Pragas de particular interesse são insetos-praga, particularmente insetos-praga que causam danos significativos para plantas agrícolas. Entende-se como “insetos-praga” insetos e outras pragas similares tais como, por exemplo, os insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., particularmente, Lepidoptera especialmente broca gigante da cana-de-açúcar, *Telchin licus licus*. Insetos-praga da presente invenção da maioria das cultivares incluem, mas não estão limitadas a Milho: *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea grandiosella*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Diatraea saccharalis*, *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica longicornis barberi*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Melanotus* spp., *Cyclocephala borealis*, *Cyclocephala immaculata*, *Popillia japonica*, *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*, *Rhopalosiphum maidis*, *Anuraphis maidiradicis*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus sanguinipes*, *Hylemya platura*, *Agromyza parvicornis*, *Anaphothrips obscurus*, *Solenopsis milesta*, *Tetranychus urticae*; Sorgo: *Chilo partellus*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Feltia subterranea*, *Phyllophaga crinita*, *Eleodes*, *Conoderus*, e *Aeolus* spp., *Oulema melanopus*, *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*, *Rhopalosiphum maidis*, *Sipha flava*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Contarinia sorghicola*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Tetranychus urticae*; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, *Spodoptera frugiperda*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Agrotis orthogonia*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Oulema melanopus*, *Hypera punctata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Schizaphis graminum*, *Macrosiphum avenae*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*,

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

Os exemplos abaixo são colocados de forma a ilustrar e elucidar melhor a invenção e não podem ser tidos como forma de limitar a presente invenção.

EXEMPLOS

Técnicas usuais de biologia molecular (p.ex.: transformação de bactérias e eletroforese em gel de agarose de ácidos nucleicos) estão descritas por meio de termos comumente empregados. Detalhes da prática de tais técnicas são descritos em Sambrook et al (Sambrook, J., Russell, D. W., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989).

Exemplo 1 – Geração de genes mutantes, análogos ao gene cry1la12 nativo, altamente eficazes no controle de *T. l. licus* pela técnica de embaralhamento do DNA.

A construção de biblioteca de genes recombinantes análogos ao gene cry1la12 é uma importante estratégia biotecnológica, contribuindo de modo importante em programas de melhoramento de plantas, via transformação genética para geração de transgênicos. Esta tecnologia disponibiliza uma variedade de novas moléculas com potencial uso na transformação de plantas visando o controle do inseto-alvo, bem como a melhoria da atividade inseticida de novas proteínas codificadas pelos genes recombinantes.

Em estudos prévios (Grossi-de-Sá, MF, Magalhães, MQ, Silva, MS, Silva, SMB, Dias, SC, Nakasu, EYT, Brunetta, PSF, Oliveira, GR, Oliveira Neto, OB, Oliveira, RS, Soares, LHB, Ayub, MAS, Siqueira, HAA, Figueira, ELZ (2007) Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1la-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. **40** (5), 773-782; Craveiro, KIC, Gomes Júnior, JE, Silva, MCM, Macedo, LLP, Lucena, WA, Silva, MS, Antonino-Souza Júnior, JD, Oliveira, GR, Magalhães, MTQ, Santiago, AD, Grossi-de-Sá, MF (2010) Variant Cry1l toxins generated by DNA shuffling are active against sugar cane giant borer. *Journal of Biotechnology*. **145**, 215-221), foi demonstrado que a toxina Cry1la12 apresenta atividade moderada contra insetos lepidópteros e, com o objetivo de obter, *in vitro*, novos genes, análogos ao gene cry1la12, altamente eficazes contra *T. l. licus*, foi realizada a técnica de DNA shuffling. Para isso, o gene selvagem cry1la12 (SEQ ID NO 1) foi reamplificado por PCR com oligonucleotídeos específicos para sequência gênica em questão,

os quais contêm o sítio para a enzima de restrição Sfi I (Cry1IaShuffFOR_SfiExtr_AP:5'GAGGCCAGGCCGAGTAGTGGCGTG TCAGGATCCTGTTTAAAAATGTCTGAG3' e Cry1IaShuffREV_SfiExtr_AP:5' CGAGGCCGGCCTGGCCCAACATGTAGCCGCATGCGCGTTCTACCGGAA CAAATTCAATTC3'). Estes oligonucleotídeos foram então utilizados em uma reação de PCR com volume final de 50 µL, contendo 150 nM de cada oligonucleotídeo específico, 400 µM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂, 1X do tampão para a enzima Taq DNA Polimerase (Cenbiot®), 1,5 U de TaqDNA polimerase (Cenbiot®) e 200 ng de DNA cry1Ia12. A amplificação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf®) sob as seguintes condições: 95°C por 2 minutos; 35 ciclos: 45 segundos a 95 °C (desnaturação), 45 segundos a 60°C (anelamento dos oligonucleotídeos) e 2 minutos a 72 °C (extensão da DNA polimerase) e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Uma alíquota dos produtos da PCR (um produto de aproximadamente 2000 pb) foi analisada em gel de agarose 1% e o restante foi purificado utilizando o QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN). Seguindo o protocolo da técnica de DNA shuffling (Stemmer, WPC (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*. **370**, 389-391; Zhao, H & Arnold, FH (1997) Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Research*. **25**, 1307-1308), vinte microgramas do gene cry1Ia12 com os sítios para a enzima de restrição Sfi I foram liofilizados, solubilizados em tampão de DNase I e digeridos com 30 U de DNase I a 15°C por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 5 µL de EDTA 0,5 M. Uma alíquota do produto da digestão foi analisada em gel de agarose 2,5%. O restante do produto da digestão foi purificado utilizando colunas Microcon® YM-100 (Millipore), seguindo as instruções do fabricante visando a recuperação de fragmentos de até 125 pb. Os fragmentos do gene cry1Ia12 purificados foram utilizados em uma reação de PCR com volume final de 25 µL, sem a adição de oligonucleotídeos iniciadores, 400 µM de dNTPs, 1 mM de MgSO₄, 5X do tampão para a enzima TaqPlatinum DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen®), 2,5 U de Taq Platinum DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen®) e 1,5 µg de DNA

de fragmentos do gene cry11a12. A reação foi realizada em termociclador (Mastercycler Gradient – Eppendorf®) sob as seguintes condições: 95°C por 2 minutos; 44 ciclos: 95°C por 1 minuto (desnaturação), 42°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C por 1 minuto (com um acréscimo de 5 segundos no tempo de extensão a cada ciclo) e uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Esta primeira reação da técnica de embaralhamento de DNA gerou um montante de fragmentos de tamanhos variados. Este novo produto foi então utilizado na segunda reação de PCR (50 µL) como molde, nas seguintes condições: um microlitro e meio do produto da primeira reação, 1X do Tampão Taq Platinum DNA Polimerase High Fidelity 1X, 0,2 mM dNTPs, 0,8 µM dos oligonucleotídeos específicos Shuff2FOR_SfiExtr_AP (5' CGAGGCCAGGCGGCCAGTAGTGGCGTGTCAGGATCC 3') e Shuff2REV_SfiExtr_AP (5' CGAGGCCGGCCTGGCCCAACATGTAGCCGCATGCGCG 3'), 2mM MgSO4 e 10 U na mistura de 1:1 Taq Platinum DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen®)/Taq DNA Polimerase (Cenbiot®). A reação de amplificação foi realizada em termociclador (MastercyclerGradient – Eppendorf) sob as seguintes condições: 95°C por 2 minutos, 10 ciclos: 95°C por 30 segundos (desnaturação); 42°C por 1 minuto (anelamento dos fragmentos) e 72°C por 1 minuto (extensão da DNA polimerase), 14 ciclos: 95°C por 1 minuto, 42°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto (com um acréscimo de 20 segundos por ciclo), com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Dessa forma, o gene cry11a12 selvagem submetido à técnica de embaralhamento de DNA, gerou uma população de genes variantes, seja pela introdução, deleção ou substituição de nucleotídeos (Figura 1). Esse produto foi analisado em gel de agarose 1% e o amplicon de aproximadamente 2000 pb, correspondendo à população de genes cry11a12 variantes, foi excisado e purificado com o QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). O vetor fagomídeo pCOMB3X (Andris-Widhopf, J, Rader, C, Steinberger, P, Fuller, R, Barbas III, CF (2000) Methods for the generation of chicken monoclonal antibody fragments by Phage display. Journal of Immunological Methods, **242**: 159-181) foi submetido à digestão com a enzima de restrição Sfi I. Foram utilizados 2 µg

de DNA do vetor, tampão NEB2 1X, BSA 1 mg/mL e 40 U Sfi I (New England Biolabs®), para um volume final de reação de 40 µL, ocorrendo a 50°C por 2 horas. As mesmas condições foram obedecidas para as digestões dos genes cry1Ia12 selvagem e variantes. Os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 0,8% e as bandas correspondentes ao vetor fagomídeo pCOMB3X linearizado (aproximadamente 3000 pb) e aos genes cry1Ia12 selvagem e variantes (aproximadamente 2000 pb) foram excisadas e purificadas com o QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). Os novos genes reconstruídos, análogos ao gene cry1Ia12 selvagem, foram clonados no vetor com auxílio da enzima T4 DNA Ligase® (Invitrogen). Adicionou-se o vetor e os genes cry foram misturados na proporção de 4:1 (vetor:inseto), com a adição do tampão da enzima T4 DNA Ligase 1X, enzima T4 DNA Ligase 1U e ATP 20 mM, num volume final de 25 µL, a 15°C por 16 horas. O produto da ligação (pCOMB3X + cry1Ia12) foi utilizado para transformar células E. coli XL-1 Blue, via eletroporação. Os transformantes foram crescidos em meio LB contendo ampicilina 100 mg/mL e indicaram um título de 10⁶ células para a biblioteca combinatória de genes cry1Ia12 variantes. Uma parte dessas colônias foi analisada por PCRs de colônia e os DNAs das colônias apresentando o transgene foram preparados e as sequências determinadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores MMB4 (5' GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGT 3'), MMB5 (5' CGTCCATTGCATTCTTTAAT 3').

Exemplo 2 – Seleção das toxinas Cry1Ia12 variantes, análogas à toxina Cry1Ia12 selvagem, pela técnica de Phage display.

A biblioteca de genes análogos ao cry1Ia12 gerada por embaralhamento do DNA e fusionados a proteína III do capsídeo do fago filamentoso M13 (fagos de fusão) foi então selecionada pela técnica de apresentação de proteínas na superfície de bacteriófagos - Phage Display (Barbas III, CF, Burton, DR, Scott, JK, Silverman, GJ (2001) Selection from antibody libraries. In: Phage display – A Laboratory Manual – USA: Cold Spring Laboratory, 10.1 – 10.20) utilizando como ligantes BBMV de *T. l. licus* (Francis, BR, Maaty, WSA, Bulla Jr., LA (1998) Effects of Midgut-Protein-Preparative and Ligand Binding

Procedures on the Toxin Binding Characteristics of BT-R1, a Common High-Affinity Receptor in *Manduca sexta* for Cry1A *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (6): 2158–2165). No procedimento de seleção por afinidade de ligação, os fagos fusionados às toxinas Cry1a12 foram depositados em poços de uma placa de microtitulação previamente sensibilizadas com BBMV's (100 µg/µL), extraídas da membrana do intestino de larvas da broca gigante da cana-de-açúcar. A cada ciclo de seleção, os poços são lavados com solução PBS-Tween (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Na₂HPO₄, 1,2 mM KH₂PO₄ e 0,05% Tween 20®) e, os fagos específicos, eluídos em pH baixo, são usados para transfectar novas células de *E. coli*. As partículas de fagos amplificadas são utilizadas no sucessivo ciclo de seleção. O procedimento envolveu cinco ciclos de lavagem, eluição e amplificação. A titulação das colônias coletadas em cada ciclo é feito pelo plaqueamento de colônias em diluições seriadas em meio SBágar contendo carbenicilina 100 µg/mL. As colônias isoladas do montante de fagos específicos eluídos no quarto ciclo de seleção (indicados como o ciclo de enriquecimento de fagos específicos) foram amplificadas com oligonucleotídeos específicos para as extremidades do vetor fagomídeo pCOMB3X, nas quais estão ligados os genes cry1a12. Cinco colônias mostrando amplificação em PCR e contendo aproximadamente 2000 pb (tamanho do gene original) foram selecionadas para a expressão em *E. coli*.

Exemplo 3 – Expressão dos genes selvagem e variantes em *E. coli* XL-1 Blue.

Os genes cry1a12 selvagem e variantes selecionados por Phage display e com o tamanho esperado do inserto (aproximadamente 2000 pb), indicado pelas PCRs de colônia, foram utilizados para expressão em *E. coli* após indução por IPTG (Barbas III, CF, Burton, DR, Scott, JK, Silverman, GJ (2001) Analysis of Antibody Fragment-expressing Clones in ELISA. In: Phage display – A Laboratory Manual – USA: Cold Spring Laboratory, 11.9 – 11.12). As colônias selecionadas foram inoculadas em meio SB contendo carbenicilina [100 mg/mL] e incubadas a 37°C, sob agitação de 200 rpm até

atingir a de $DO_{600nm} = 0,5$. A expressão foi induzida pela adição de IPTG (concentração final de 2 mM) utilizando agitação de 300 rpm por 16 horas a 37°C. Para obter as toxinas Cry, a partir do lisado celular, as culturas induzidas foram centrifugadas a 2000 x g por 10 minutos. Os sedimentos foram solubilizados em TBS (2% do volume), e transferidos para tubos de microcentrífugas. As células foram lisadas por congelamento em nitrogênio líquido por 5 minutos seguido por descongelamento em banho-maria a 37°C por 3 minutos, repetindo-se esse procedimento por três vezes. Os restos celulares foram separados por centrifugação a 15000 x g por 15 minutos e o sobrenadante contendo as toxinas Cry expressas, armazenados para utilização nos ensaios de atividade.

Exemplo 4 – Bioensaios seletivos contra broca gigante da cana-de-açúcar para determinação da atividade entomotóxica das δ -endotoxina Cry1Ia12 análogas.

Fêmeas adultas de *T. l. licus* foram coletadas em campo e acondicionadas em gaiolas com o fundo telado, de modo a permitir a separação dos ovos depositados. Após 24 horas, os ovos foram coletados e mantidos em câmara insetária (tipo B.O.D.) a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de umidade relativa. Ovos com oito dias foram individualizados em placas de 96 poços, permitindo assim, a eclosão das larvas em reservatórios separados. As larvas, depois de eclodidas, foram mantidas sobre um substrato esponjoso, o qual foi umedecido com uma dieta líquida, modificada a partir da dieta já estabelecida por HENSLEY E HAMMOND (1968) para a criação de *Diatraea saccharalis*. As larvas que conseguiram se alimentar da dieta mudaram de coloração e foram então transferidas para uma nova placa, contendo nova dieta, permanecendo nesta até sua utilização nos bioensaios, por um período máximo de 7 dias. Devido à característica de canibalismo das larvas de *T. l. licus*. Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, para que as larvas ficassem individualizadas. Cada poço do experimento continha uma esponja (80% de viscosa, 20% de poliéster) com, aproximadamente 1 cm², previamente embebida em suspensão de dieta líquida, com 3,5 µg/mL das toxinas Cry1Ia12 original (SEQ ID NO 7) e variantes I, II, III, IV e V (SEQ

ID NOs 8-12) expressas em bactéria. O tratamento-testemunha foi realizado com dieta sem nenhuma bactéria. Os experimentos foram realizados em triplicata em que cada unidade experimental consistia de 12 larvas de 1° instar, individualizadas em cada poço contendo os diferentes tratamentos.

As placas foram mantidas em câmara climatizada a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, UR $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. Após cinco dias, o experimento foi interrompido para a avaliação de mortalidade larval dos diferentes tratamentos. Os valores de mortalidade foram comparados utilizando-se de análise de variância pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5% (Figura 2).

Exemplo 5 – Determinação da sequência primária das toxinas análogas Cry1Ia12.

Os genes análogos cry1Ia12 selecionados por PCRs de colônia foram submetidos a reações de sequenciamento nas seguintes condições: 500 ng de DNA plasmidial contendo os análogos e 3 μM de oligonucleotídeos específicos (VarPhaDisp_Int_FOR (5' CTTTAGCATTATTGTGTTCC 3'), VarPhaDisp_Int_REV (5' CGCATACCCGTACGACGTTCC 3'), VarPhaDisp_Int_FOR_2 (5' GAAATCGTAATAACACAAGGG 3') e VarPhaDisp_Int_REV_2 (5' CCAGCACCATCACCATCACC 3')), em um sequenciador automático modelo ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Ao final, foram selecionadas cinco sequências análogas ao gene cry1Ia12 (variantes I, II, III, IV e V – SEQ ID NO 2-6, respectivamente). As novas moléculas geradas pela recombinação do gene cry1Ia12 apresentaram diferenças de 0,15 a 1,24% de resíduos de aminoácidos modificados. Para a análise das sequências e classificação das mesmas como análogas do gene cry1Ia12 selvagem, estas moléculas foram agrupadas por similaridade de sequências nucleotídicas. Mesmo havendo mutações nucleotídicas nas sequências geradas, poucas significaram modificações de resíduos de aminoácidos (até 1,08%) (Tabela 1). Duas novas moléculas Cry1Ia12, variante II (SEQ ID NO 8) e variante V (SEQ ID NO 11), se mostraram aproximadamente 3 vezes mais ativas que a molécula selvagem (Cry1Ia12 – SEQ ID NO 1) exibindo uma mortalidade de 55,5 e 75% das larvas neonatas

alimentadas com dieta contendo 3 µg de proteína por mililitro de dieta líquida. Os modelos de Cry1Ia12 e de seus análogos mostraram o mesmo arcabouço estrutural, sendo diferenças observadas apenas nas cadeias laterais dos aminoácidos substituídos no análogo. As estruturas selvagem e análoga Cry1Ia12 apresentam os três domínios funcionais conservados (I, II, e III), típicos das toxinas Cry.

Tabela 1. Mutações encontradas nas toxinas Cry1Ia12 variantes.

Variantes Cry1Ia12	Mutações	Domínio
I (SEQ ID NO 8)	S84G	I
	R159K	I
	G380R	II
II (SEQ ID NO 9)	S84G	I
	R159K	I
	L212del	I
	S213del	I
	D233N	I
	Q413S	II
	P414T	II
	P419L	II
III (SEQ ID NO 10)	S84G	I
IV (SEQ ID NO 11)	S84G	I
	R159K	I
	G380R	II
	K426_F427insK	II
V (SEQ ID NO 12)	D233N	

REIVINDICAÇÕES

1. Moléculas isoladas de ácido nucleico caracterizadas por compreender:
 - a) sequências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6;
 - b) complementos das sequências descritas em SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6;
 - c) complementos reversos das sequências descritas em SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6;
 - d) sequências reversas das sequências descritas em SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6.
2. Construção gênica caracterizada por compreender a molécula isolada da reivindicação 1.
3. Construção gênica caracterizada por compreender:
 - a) um promotor opcionalmente ligado a uma sequência líder e operacionalmente ligado a
 - b) uma sequência codificadora selecionada do grupo identificado como SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6.
4. Construção gênica de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato do promotor ser selecionado do grupo consistindo de constitutivos, induzíveis e tecido-específicos.
5. Construção gênica de acordo com a reivindicação 4 caracterizada pelo fato do promotor tecido-específico ser selecionado entre promotores Ubi1, Ubi 9 e Act1.
6. Construção gênica de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato do promotor conter elementos enhancers.
7. Construção gênica de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato do promotor poder ser expresso em plantas, animais, bactérias, fungos ou insetos.
8. Construção gênica de acordo com a reivindicação 3 caracterizada pelo fato da sequência líder ser obtida do mesmo gene que o promotor utilizado para dirigir a transcrição da molécula isolada de ácido nucleico.

9. Vetor binário caracterizado por conter uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2-8.
10. Vetor binário caracterizado por compreender:
 - a. um promotor opcionalmente ligado a uma sequência líder e operacionalmente ligado a
 - b. uma sequência codificadora selecionada do grupo identificado como SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 ou SEQ ID NO 6 operacionalmente ligada a
 - c. um sinal de terminação;
 - d. uma origem de replicação;
 - e. um marcador seletivo; e
 - f. um sítio de clonagem.
11. Vetor binário de acordo com a reivindicação 10 caracterizado pelo fato do promotor ser selecionado do grupo consistindo de constitutivos, induzíveis e tecido-específicos.
12. Vetor binário de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo fato do promotor constitutivo ser selecionado entre promotores Ubi1, Ubi9 e Act1.
13. Vetor binário de acordo com a reivindicação 10 caracterizado pelo fato do promotor conter elementos enhancers.
14. Vetor binário de acordo com a reivindicação 10 caracterizado pelo fato da sequência líder ser obtida do mesmo gene que o promotor utilizado para dirigir a transcrição da molécula isolada de ácido nucleico.
15. Vetor binário de acordo com a reivindicação 10 caracterizado pelo fato do promotor poder ser expresso em plantas, animais, bactérias, fungos ou insetos.
16. Vetor binário de acordo com a reivindicação 10 caracterizado pelo fato do sinal de terminação ser selecionado do grupo sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (NOS), sinal de terminação do gene da octopina sintetase, sinal de terminação do gene 19S e 35S do CaMV, sinal de terminação do gene da álcool desidrogenase de milho, sinal de terminação do gene da manopina sintetase, sinal de

terminação do gene da beta-faseolina, sinal de terminação do gene da ssRUBISCO, sinal de terminação do gene da sucrose sintetase, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans* e outros semelhantes.

17. Vetor binário de acordo com a reivindicação 10 caracterizado pelo fato do marcador seletivo ser selecionado entre sequências que conferem resistência a antibióticos ou marcadores visuais.

18. Vetor binário de acordo com a reivindicação 17 caracterizado pelo fato do marcador seletivo ser selecionado entre as sequências codificadoras dos genes canamicina, neomicina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, higromicina, geneticina, fosfotricina, glifosato, glufosinato de amônio, AHAS, BAR e GUS.

19. Polipeptídeos isolados, caracterizados por compreender sequências substancialmente similares a qualquer uma das sequências selecionadas do grupo identificado como SEQ ID NO 8-12.

20. Polipeptídeos de acordo com a reivindicação 19, caracterizados por exibir atividade inseticida, quando administrado oralmente, a larvas de insetos susceptíveis.

21. Polipeptídeos de acordo com a reivindicação 19, caracterizados por exibir atividade inseticida, quando fornecido em uma dieta administrada oralmente a uma larva de inseto lepdóptero.

22. Polipeptídeos de acordo com a reivindicação 21, caracterizados pelo fato de a larva de inseto ser uma larva de broca gigante da cana-de-açúcar.

23. Polipeptídeos isolados de acordo com as reivindicações 19 a 22, caracterizados por ser uma δ -endotoxina.

24. Célula transformada caracterizada pelo fato de conter uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8.

25. Célula transformada caracterizada pelo fato de conter um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 18.

26. Célula transformada caracterizada pelo fato de conter um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 23.

27. Célula transformada de acordo com as reivindicações 24-26 caracterizada pelo fato da célula ser oriunda de qualquer um dos grupos consistindo de bactérias, fungos, insetos, mamíferos e vegetais.

28. Planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma caracterizada por compreender uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8.

29. Planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma caracterizada por compreender um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 18.

30. Planta, ou uma parte, ou um propágulo ou progênie da mesma caracterizada pelo fato de possuir um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 23.

31. Microorganismo, ou uma parte do mesmo caracterizado por compreender uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8.

32. Microorganismo, ou uma parte do mesmo caracterizado por compreender um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 18.

33. Microorganismo, ou uma parte do mesmo caracterizado por compreender um polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 23.

34. Método para produzir um organismo geneticamente modificado caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8 ou um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 18;

b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;

c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);

d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo a construção gênica ou vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 18.

35. Método para produção de proteína recombinante caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

a. transformar uma célula, tecido, órgão ou embrião com um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 18;

b. selecionar células transformadas, calos de células, embriões ou sementes;

c. regenerar plantas maduras, embriões maduros ou microorganismos de células transformadas, calos de células, embriões ou sementes selecionados na etapa (b);

d. selecionar plantas maduras, embriões maduros ou células de microorganismos da etapa (c) contendo vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 18;

e. Fazer a extração da proteína recombinante produzida nos organismos selecionados na etapa (d).

36. Proteína recombinante obtida através do método descrito na reivindicação 35.

37. Proteína recombinante de acordo com a reivindicação 36 caracterizada pelo fato da proteína ter atividade δ -endotoxina.

38. Composição pesticida biodegradável caracterizada por compreender uma concentração eficaz do polipeptídeo isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 23 ou análogo mutante, em um veículo carreador agronomicamente aceitável.

39. Composição pesticida biodegradável de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de o veículo carreador aceitável ser um microorganismo transformado.

40. Composição pesticida biodegradável de acordo com a reivindicação 39, caracterizada pelo fato de que um veículo carreador aceitável pode ser um agente superfície-ativo, um veículo carreador inerte, um preservativo, um umectante, um estimulante de alimentação, um atrativo, um agente

encapsulante, um ligante, um emulsificador, um corante, um protetor uv (ultra-violeta), um tampão, um agente de fluxo ou fertilizante, doadores de micronutriente, ou outras preparações que influenciam o crescimento da planta.

41. Composição pesticida biodegradável de acordo com a reivindicação 38, caracterizada pelo fato de o polipeptídeo uma das reivindicações de 19 a 23 ou análogo mutante ser usado em combinação com outras proteínas inseticidas.

42. Método para o controle de uma praga caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) detectar a ocorrência da praga em um ambiente;
- b) promover o contato da praga com uma proteína pesticida isolada ou com uma composição da invenção, em que a referida proteína consiste das sequências selecionadas do grupo de sequências de aminoácidos descritas em SEQ ID N^o. 8-12.

43. Método de obtenção de linhagens transgênicas resistentes a um inseto praga, caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- a) transformar uma cultivar de interesse com uma construção gênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 8 ou um vetor binário de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 18;
- b) regenerar linhagens transgênicas contendo a referida construção estavelmente integrada em seus genomas;
- c) selecionar as linhagens transgênicas com os maiores níveis de expressão da δ -endotoxina da invenção.

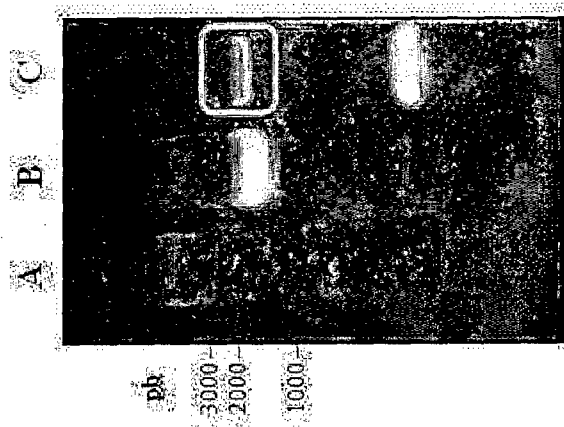


Fig. 1

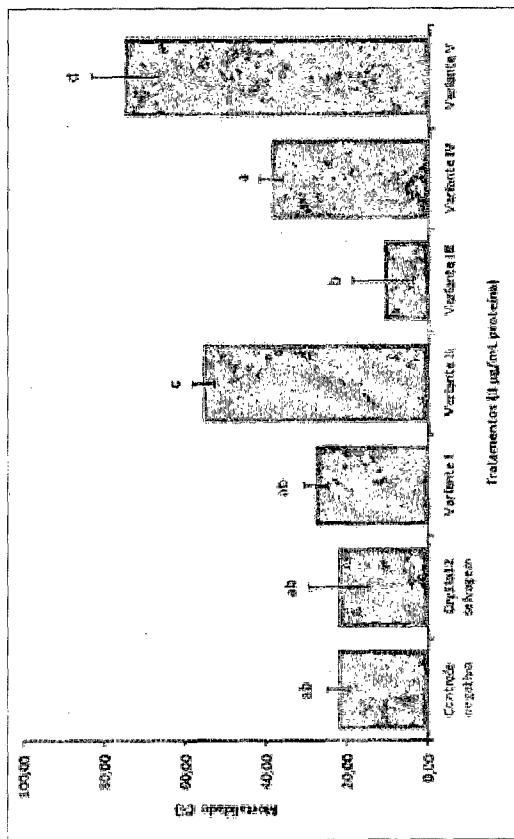


Fig. 2

CRY1a12
 Variante I
 Variante II
 Variante III
 Variante IV
 Variante V

MKLKNQKHQ
 SFSNAKVDK
 ISTDLSKNET
 DIELONINHE
 DELMASEVEN
 VEPTYSASTI
 OIGIGIAGKI
 LGTUGVPPAG
 MKLKNQKHQ
 SFSNAKVDK
 ISTDLSKNET
 DIELONINHE
 DELMASEVEN
 VEPTYSASTI
 OIGIGIAGKI
 LGTUGVPPAG
 MKLKNQKHQ
 SFSNAKVDK
 ISTDLSKNET
 DIELONINHE
 DELMASEVEN
 VEPTYSASTI
 OIGIGIAGKI
 LGTUGVPPAG
 MKLKNQKHQ
 SFSNAKVDK
 ISTDLSKNET
 DIELONINHE
 DELMASEVEN
 VEPTYSASTI
 OIGIGIAGKI
 LGTUGVPPAG
 MKLKNQKHQ
 SFSNAKVDK
 ISTDLSKNET
 DIELONINHE
 DELMASEVEN
 VEPTYSASTI
 OIGIGIAGKI
 LGTUGVPPAG

CRY1a2
 Variante I
 Variante II
 Variante III
 Variante IV
 Variante V

OVALYSFLL
 GELWPKGKQ
 WEITMEVZE
 LINOKISPIYA
 RNKALFDLKG
 LGDALA YHD
 SLESWGNRN
 NTPRARSVRS
 OVALYSFLL
 GELWPKGKQ
 WEITMEVZE
 LINOKISPIYA
 RNKALFDLKG
 LGDALA YHD
 SLESWGNRN
 NTPRARSVRS
 OVALYSFLL
 GELWPKGKQ
 WEITMEVZE
 LINOKISPIYA
 RNKALFDLKG
 LGDALA YHD
 SLESWGNRN
 NTPRARSVRS
 OVALYSFLL
 GELWPKGKQ
 WEITMEVZE
 LINOKISPIYA
 RNKALFDLKG
 LGDALA YHD
 SLESWGNRN
 NTPRARSVRS
 OVALYSFLL
 GELWPKGKQ
 WEITMEVZE
 LINOKISPIYA
 RNKALFDLKG
 LGDALA YHD
 SLESWGNRN
 NTPRARSVRS

CRY1a2
 Variante I
 Variante II
 Variante III
 Variante IV
 Variante V

OYTALELMV
 QKQPSFVSG
 EEPPLPIYA
 QANLHLELL
 RDASTFGKEM
 GLSSSEISTF
 YNROVERAGD
 YSDHCVKWYS
 OYTALELMV
 QKQPSFVSG
 EEPPLPIYA
 QANLHLELL
 RDASTFGKEM
 GLSSSEISTF
 YNROVERAGD
 YSDHCVKWYS
 OYTALELMV
 QKQPSFVSG
 EEPPLPIYA
 QANLHLELL
 RDASTFGKEM
 GLSSSEISTF
 YNROVERAGD
 YSDHCVKWYS
 OYTALELMV
 QKQPSFVSG
 EEPPLPIYA
 QANLHLELL
 RDASTFGKEM
 GLSSSEISTF
 YNROVERAGD
 YSDHCVKWYS
 OYTALELMV
 QKQPSFVSG
 EEPPLPIYA
 QANLHLELL
 RDASTFGKEM
 GLSSSEISTF
 YNROVERAGD
 YSDHCVKWYS

CRY1a12
 Variante I
 Variante II
 Variante III
 Variante IV
 Variante V

RGLNNRGTN
 AESWVRNQE
 RRDMLAVLD
 LVALFESYDI
 OMYPKITPAQ
 LIREVYIDAI
 GIVRHPSPST
 SITWYNNAR
 RGLNNRGTN
 AESWVRNQE
 RRDMLAVLD
 LVALFESYDI
 OMYPKITPAQ
 LIREVYIDAI
 GIVRHPSPST
 SITWYNNAR
 RGLNNRGTN
 AESWVRNQE
 RRDMLAVLD
 LVALFESYDI
 OMYPKITPAQ
 LIREVYIDAI
 GIVRHPSPST
 SITWYNNAR
 RGLNNRGTN
 AESWVRNQE
 RRDMLAVLD
 LVALFESYDI
 OMYPKITPAQ
 LIREVYIDAI
 GIVRHPSPST
 SITWYNNAR
 RGLNNRGTN
 AESWVRNQE
 RRDMLAVLD
 LVALFESYDI
 OMYPKITPAQ
 LIREVYIDAI
 GIVRHPSPST
 SITWYNNAR

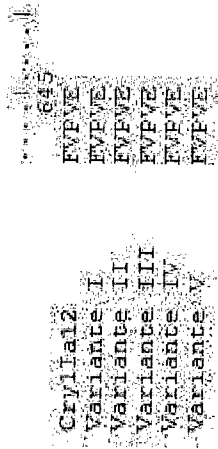


Fig. 3a

... ..

165 175 185 195 205 215 225 235

Civ11a12
 TTGTTAGTGC ATCAACAAAT CAACAGGTA TTGGTATTC GGGTAAATA CTGGTACCC TAGGGTTCCT TTATGGCAGCA
 Variante I
 TTGTTAGTGC ATCAACAAAT CAACAGGTA TTGGTATTC GGGTAAATA CTGGTACCC TAGGGTTCCT TTATGGCAGCA
 Variante II
 TTGTTAGTGC ATCAACAAAT CAACAGGTA TTGGTATTC GGGTAAATA CTGGTACCC TAGGGTTCCT TTATGGCAGCA
 Variante III
 TTGTTAGTGC ATCAACAAAT CAACAGGTA TTGGTATTC GGGTAAATA CTGGTACCC TAGGGTTCCT TTATGGCAGCA
 Variante IV
 TTGTTAGTGC ATCAACAAAT CAACAGGTA TTGGTATTC GGGTAAATA CTGGTACCC TAGGGTTCCT TTATGGCAGCA
 Variante V
 TTGTTAGTGC ATCAACAAAT CAACAGGTA TTGGTATTC GGGTAAATA CTGGTACCC TAGGGTTCCT TTATGGCAGCA

... ..

245 255 265 275 285 295 305 315

Civ11a12
 CAAGTAGCTA GCTTTATAG TTTTACTTA GGTGAGCTAT GGGCTAAGG GAAATATCAA TGGGAATCT TTATGGAAACA
 Variante I
 CAAGTAGCTA GCTTTATAG TTTTACTTA GGTGAGCTAT GGGCTAAGG GAAATATCAA TGGGAATCT TTATGGAAACA
 Variante II
 CAAGTAGCTA GCTTTATAG TTTTACTTA GGTGAGCTAT GGGCTAAGG GAAATATCAA TGGGAATCT TTATGGAAACA
 Variante III
 CAAGTAGCTA GCTTTATAG TTTTACTTA GGTGAGCTAT GGGCTAAGG GAAATATCAA TGGGAATCT TTATGGAAACA
 Variante IV
 CAAGTAGCTA GCTTTATAG TTTTACTTA GGTGAGCTAT GGGCTAAGG GAAATATCAA TGGGAATCT TTATGGAAACA
 Variante V
 CAAGTAGCTA GCTTTATAG TTTTACTTA GGTGAGCTAT GGGCTAAGG GAAATATCAA TGGGAATCT TTATGGAAACA

325
 335
 345
 355
 365
 375
 385
 395

Cyt1a12: TGTAGACAG ATTATTATTC AAAAATAATC AACCTAATGCA AGAATAAAG CACTACAGA CTTCRAAGCA TTAGGAGATG
 Variante I: TGTAGACAG ATTATTATTC AAAAATAATC AACCTAATGCA AGAATAAAG CACTACAGA CTTCRAAGCA TTAGGAGATG
 Variante II: TGTAGACAG ATTATTATTC AAAAATAATC AACCTAATGCA AGAATAAAG CACTACAGA CTTCRAAGCA TTAGGAGATG
 Variante III: TGTAGACAG ATTATTATTC AAAAATAATC AACCTAATGCA AGAATAAAG CACTACAGA CTTCRAAGCA TTAGGAGATG
 Variante IV: TGTAGACAG ATTATTATTC AAAAATAATC AACCTAATGCA AGAATAAAG CACTACAGA CTTCRAAGCA TTAGGAGATG
 Variante V: TGTAGACAG ATTATTATTC AAAAATAATC AACCTAATGCA AGAATAAAG CACTACAGA CTTCRAAGCA TTAGGAGATG

405
 415
 425
 435
 445
 455
 465
 475

Cyt1a12: CCTTAGCTGT CTACCAIGAT TCGCTTGAAA GTTGGTGG AAATCGTAAAT AACACAAGG CTAGGAGTGT TGTACAGGAGC
 Variante I: CCTTAGCTGT CTACCAIGAT TCGCTTGAAA GTTGGTGG AAATCGTAAAT AACACAAGG CTAGGAGTGT TGTACAGGAGC
 Variante II: CCTTAGCTGT CTACCAIGAT TCGCTTGAAA GTTGGTGG AAATCGTAAAT AACACAAGG CTAGGAGTGT TGTACAGGAGC
 Variante III: CCTTAGCTGT CTACCAIGAT TCGCTTGAAA GTTGGTGG AAATCGTAAAT AACACAAGG CTAGGAGTGT TGTACAGGAGC
 Variante IV: CCTTAGCTGT CTACCAIGAT TCGCTTGAAA GTTGGTGG AAATCGTAAAT AACACAAGG CTAGGAGTGT TGTACAGGAGC
 Variante V: CCTTAGCTGT CTACCAIGAT TCGCTTGAAA GTTGGTGG AAATCGTAAAT AACACAAGG CTAGGAGTGT TGTACAGGAGC

	645	655	665	675	685	695	705	715
CrV1a12	CTTCAGGAAAT TTCACATTT	TATACCGGTC	AGTCGGACCG	AGCAGGAGCA	TATCCGACC	ATTGGTGGAA	ATGGTATAGC	
Variante I	CTTCAGGAAAT TTCACATTT	TATACCGGTC	AGTCGGACCG	AGCAGGAGCA	TATCCGACC	ATTGGTGGAA	ATGGTATAGC	
Variante II	CTTCAGGAAAT TTCACATTT	TATACCGGTC	AGTCGGACCG	AGCAGGAGCA	TATCCGACC	ATTGGTGGAA	ATGGTATAGC	
Variante III	CTTCAGGAAAT TTCACATTT	TATACCGGTC	AGTCGGACCG	AGCAGGAGCA	TATCCGACC	ATTGGTGGAA	ATGGTATAGC	
Variante IV	CTTCAGGAAAT TTCACATTT	TATACCGGTC	AGTCGGACCG	AGCAGGAGCA	TATCCGACC	ATTGGTGGAA	ATGGTATAGC	
Variante V	CTTCAGGAAAT TTCACATTT	TATACCGGTC	AGTCGGACCG	AGCAGGAGCA	TATCCGACC	ATTGGTGGAA	ATGGTATAGC	
	725	735	745	755	765	775	785	795
CrV1a12	ACAGGGCTAA ATACTTGAG	GGTACGAA	GGGTACGAA	TATTCATTC	CGTAGAGACA	TGACTTTTAA		
Variante I	ACAGGGCTAA ATACTTGAG	GGTACGAA	GGGTACGAA	TATTCATTC	CGTAGAGACA	TGACTTTTAA		
Variante II	ACAGGGCTAA ATACTTGAG	GGTACGAA	GGGTACGAA	TATTCATTC	CGTAGAGACA	TGACTTTTAA		
Variante III	ACAGGGCTAA ATACTTGAG	GGTACGAA	GGGTACGAA	TATTCATTC	CGTAGAGACA	TGACTTTTAA		
Variante IV	ACAGGGCTAA ATACTTGAG	GGTACGAA	GGGTACGAA	TATTCATTC	CGTAGAGACA	TGACTTTTAA		
Variante V	ACAGGGCTAA ATACTTGAG	GGTACGAA	GGGTACGAA	TATTCATTC	CGTAGAGACA	TGACTTTTAA		

	805	815	825	835	845	855	865	875
CV112142	GGTACTAGAT	TTAGTGGCAC	TATTTCCGAG	CTATGATACA	CAATATGATC	CAATATGATC	PACAGCCCGA	CTATGATGAG
Variante I	GGTACTAGAT	TTAGTGGCAC	TATTTCCGAG	CTATGATACA	CAATATGATC	CAATATGATC	PACAGCCCGA	CTATGATGAG
Variante II	GGTACTAGAT	TTAGTGGCAC	TATTTCCGAG	CTATGATACA	CAATATGATC	CAATATGATC	PACAGCCCGA	CTATGATGAG
Variante III	GGTACTAGAT	TTAGTGGCAC	TATTTCCGAG	CTATGATACA	CAATATGATC	CAATATGATC	PACAGCCCGA	CTATGATGAG
Variante IV	GGTACTAGAT	TTAGTGGCAC	TATTTCCGAG	CTATGATACA	CAATATGATC	CAATATGATC	PACAGCCCGA	CTATGATGAG
Variante V	GGTACTAGAT	TTAGTGGCAC	TATTTCCGAG	CTATGATACA	CAATATGATC	CAATATGATC	PACAGCCCGA	CTATGATGAG
	885	895	905	915	925	935	945	955
CV112142	AGTATATAC	AGACGCAAT	GCGACAGTAC	AICCGCATCC	AGTATATACA	AGTATATACA	GGTATATATA	TATGACACCT
Variante I	AGTATATAC	AGACGCAAT	GCGACAGTAC	AICCGCATCC	AGTATATACA	AGTATATACA	GGTATATATA	TATGACACCT
Variante II	AGTATATAC	AGACGCAAT	GCGACAGTAC	AICCGCATCC	AGTATATACA	AGTATATACA	GGTATATATA	TATGACACCT
Variante III	AGTATATAC	AGACGCAAT	GCGACAGTAC	AICCGCATCC	AGTATATACA	AGTATATACA	GGTATATATA	TATGACACCT
Variante IV	AGTATATAC	AGACGCAAT	GCGACAGTAC	AICCGCATCC	AGTATATACA	AGTATATACA	GGTATATATA	TATGACACCT
Variante V	AGTATATAC	AGACGCAAT	GCGACAGTAC	AICCGCATCC	AGTATATACA	AGTATATACA	GGTATATATA	TATGACACCT

	965	975	985	995	1005	1015	1025	1035
Seq. ID: 1	GGTTCCTC	CGATAGAG	GGCCTGCT	CGAAACCC	ATCTACTC	GAATTCAG	CAAGTTAG	TTTACAGC
Variante I	GGTTCCTC	CGATAGAG	GGCCTGCT	CGAAACCC	ATCTACTC	GAATTCAG	CAAGTTAG	TTTACAGC
Variante II	GGTTCCTC	CGATAGAG	GGCCTGCT	CGAAACCC	ATCTACTC	GAATTCAG	CAAGTTAG	TTTACAGC
Variante III	GGTTCCTC	CGATAGAG	GGCCTGCT	CGAAACCC	ATCTACTC	GAATTCAG	CAAGTTAG	TTTACAGC
Variante IV	GGTTCCTC	CGATAGAG	GGCCTGCT	CGAAACCC	ATCTACTC	GAATTCAG	CAAGTTAG	TTTACAGC
Variante V	GGTTCCTC	CGATAGAG	GGCCTGCT	CGAAACCC	ATCTACTC	GAATTCAG	CAAGTTAG	TTTACAGC
Seq. ID: 2	1045	1055	1065	1075	1085	1095	1105	1115
Variante I	AAATAGTC	GGGATGCA	CTCAGTAT	GAATATGG	GGAGGACA	AACATAGA	CCGATACA	GGAGGAGC
Variante II	AAATAGTC	GGGATGCA	CTCAGTAT	GAATATGG	GGAGGACA	AACATAGA	CCGATACA	GGAGGAGC
Variante III	AAATAGTC	GGGATGCA	CTCAGTAT	GAATATGG	GGAGGACA	AACATAGA	CCGATACA	GGAGGAGC
Variante IV	AAATAGTC	GGGATGCA	CTCAGTAT	GAATATGG	GGAGGACA	AACATAGA	CCGATACA	GGAGGAGC
Variante V	AAATAGTC	GGGATGCA	CTCAGTAT	GAATATGG	GGAGGACA	AACATAGA	CCGATACA	GGAGGAGC

	1135	1145	1155	1165	1175	1185	1195
1205	1215	1225	1235	1245	1255	1265	1275
1285	1295	1305	1315	1325	1335	1345	1355
1365	1375	1385	1395	1405	1415	1425	1435
1445	1455	1465	1475	1485	1495	1505	1515
1525	1535	1545	1555	1565	1575	1585	1595
1605	1615	1625	1635	1645	1655	1665	1675
1685	1695	1705	1715	1725	1735	1745	1755
1765	1775	1785	1795	1805	1815	1825	1835
1845	1855	1865	1875	1885	1895	1905	1915
1925	1935	1945	1955	1965	1975	1985	1995
2005	2015	2025	2035	2045	2055	2065	2075
2085	2095	2105	2115	2125	2135	2145	2155
2165	2175	2185	2195	2205	2215	2225	2235
2245	2255	2265	2275	2285	2295	2305	2315
2325	2335	2345	2355	2365	2375	2385	2395
2405	2415	2425	2435	2445	2455	2465	2475
2485	2495	2505	2515	2525	2535	2545	2555
2565	2575	2585	2595	2605	2615	2625	2635
2645	2655	2665	2675	2685	2695	2705	2715
2725	2735	2745	2755	2765	2775	2785	2795
2805	2815	2825	2835	2845	2855	2865	2875
2885	2895	2905	2915	2925	2935	2945	2955
2965	2975	2985	2995	3005	3015	3025	3035
3045	3055	3065	3075	3085	3095	3105	3115
3125	3135	3145	3155	3165	3175	3185	3195
3205	3215	3225	3235	3245	3255	3265	3275
3285	3295	3305	3315	3325	3335	3345	3355
3365	3375	3385	3395	3405	3415	3425	3435
3445	3455	3465	3475	3485	3495	3505	3515
3525	3535	3545	3555	3565	3575	3585	3595
3605	3615	3625	3635	3645	3655	3665	3675
3685	3695	3705	3715	3725	3735	3745	3755
3765	3775	3785	3795	3805	3815	3825	3835
3845	3855	3865	3875	3885	3895	3905	3915
3925	3935	3945	3955	3965	3975	3985	3995
4005	4015	4025	4035	4045	4055	4065	4075
4085	4095	4105	4115	4125	4135	4145	4155
4165	4175	4185	4195	4205	4215	4225	4235
4245	4255	4265	4275	4285	4295	4305	4315
4325	4335	4345	4355	4365	4375	4385	4395
4405	4415	4425	4435	4445	4455	4465	4475
4485	4495	4505	4515	4525	4535	4545	4555
4565	4575	4585	4595	4605	4615	4625	4635
4645	4655	4665	4675	4685	4695	4705	4715
4725	4735	4745	4755	4765	4775	4785	4795
4805	4815	4825	4835	4845	4855	4865	4875
4885	4895	4905	4915	4925	4935	4945	4955
4965	4975	4985	4995	5005	5015	5025	5035
5045	5055	5065	5075	5085	5095	5105	5115
5125	5135	5145	5155	5165	5175	5185	5195
5205	5215	5225	5235	5245	5255	5265	5275
5285	5295	5305	5315	5325	5335	5345	5355
5365	5375	5385	5395	5405	5415	5425	5435
5445	5455	5465	5475	5485	5495	5505	5515
5525	5535	5545	5555	5565	5575	5585	5595
5605	5615	5625	5635	5645	5655	5665	5675
5685	5695	5705	5715	5725	5735	5745	5755
5765	5775	5785	5795	5805	5815	5825	5835
5845	5855	5865	5875	5885	5895	5905	5915
5925	5935	5945	5955	5965	5975	5985	5995
6005	6015	6025	6035	6045	6055	6065	6075
6085	6095	6105	6115	6125	6135	6145	6155
6165	6175	6185	6195	6205	6215	6225	6235
6245	6255	6265	6275	6285	6295	6305	6315
6325	6335	6345	6355	6365	6375	6385	6395
6405	6415	6425	6435	6445	6455	6465	6475
6485	6495	6505	6515	6525	6535	6545	6555
6565	6575	6585	6595	6605	6615	6625	6635
6645	6655	6665	6675	6685	6695	6705	6715
6725	6735	6745	6755	6765	6775	6785	6795
6805	6815	6825	6835	6845	6855	6865	6875
6885	6895	6905	6915	6925	6935	6945	6955
6965	6975	6985	6995	7005	7015	7025	7035
7045	7055	7065	7075	7085	7095	7105	7115
7125	7135	7145	7155	7165	7175	7185	7195
7205	7215	7225	7235	7245	7255	7265	7275
7285	7295	7305	7315	7325	7335	7345	7355
7365	7375	7385	7395	7405	7415	7425	7435
7445	7455	7465	7475	7485	7495	7505	7515
7525	7535	7545	7555	7565	7575	7585	7595
7605	7615	7625	7635	7645	7655	7665	7675
7685	7695	7705	7715	7725	7735	7745	7755
7765	7775	7785	7795	7805	7815	7825	7835
7845	7855	7865	7875	7885	7895	7905	7915
7925	7935	7945	7955	7965	7975	7985	7995
8005	8015	8025	8035	8045	8055	8065	8075
8085	8095	8105	8115	8125	8135	8145	8155
8165	8175	8185	8195	8205	8215	8225	8235
8245	8255	8265	8275	8285	8295	8305	8315
8325	8335	8345	8355	8365	8375	8385	8395
8405	8415	8425	8435	8445	8455	8465	8475
8485	8495	8505	8515	8525	8535	8545	8555
8565	8575	8585	8595	8605	8615	8625	8635
8645	8655	8665	8675	8685	8695	8705	8715
8725	8735	8745	8755	8765	8775	8785	8795
8805	8815	8825	8835	8845	8855	8865	8875
8885	8895	8905	8915	8925	8935	8945	8955
8965	8975	8985	8995	9005	9015	9025	9035
9045	9055	9065	9075	9085	9095	9105	9115
9125	9135	9145	9155	9165	9175	9185	9195
9205	9215	9225	9235	9245	9255	9265	9275
9285	9295	9305	9315	9325	9335	9345	9355
9365	9375	9385	9395	9405	9415	9425	9435
9445	9455	9465	9475	9485	9495	9505	9515
9525	9535	9545	9555	9565	9575	9585	9595
9605	9615	9625	9635	9645	9655	9665	9675
9685	9695	9705	9715	9725	9735	9745	9755
9765	9775	9785	9795	9805	9815	9825	9835
9845	9855	9865	9875	9885	9895	9905	9915
9925	9935	9945	9955	9965	9975	9985	9995

	1285	1295	1305	1315	1325	1335	1345	1355
CV11a12	TTGGTCACA	CAICCGAICG	CAICGATAT	TTTCATATAT	CCAGGCTATG	CTGGAAATGG	GACGGAAATA	CAGGATTCAG
Variante I	TTGGTCACA	CAICCGAICG	CAICGATATA	TTTCATATA	CCAGGCTATG	CTGGAAATGG	GACGGCAATA	CAGGATTCAG
Variante II	TTGGTCACA	CAICCGAICG	CAICGATATA	TTTCATATA	CCAGGCTATG	CTGGAAATGG	GACGGCAATA	CAGGATTCAG
Variante III	TTGGTCACA	CAICCGAICG	CAICGATATA	TTTCATATA	CCAGGCTATG	CTGGAAATGG	GACGGCAATA	CAGGATTCAG
Variante IV	TTGGTCACA	CAICCGAICG	CAICGATATA	TTTCATATA	CCAGGCTATG	CTGGAAATGG	GACGGCAATA	CAGGATTCAG
Variante V	TTGGTCACA	CAICCGAICG	CAICGATATA	TTTCATATA	CCAGGCTATG	CTGGAAATGG	GACGGCAATA	CAGGATTCAG
	1365	1375	1385	1395	1405	1415	1425	1435
CV11a12	AAATGAAAT	ACCACCTGAA	GCACAGGAC	AGCCAAATA	TGAATCTTAT	AGTCATAGAT	TAICICATAT	AGGACICAT
Variante I	AAATGAAAT	ACCACCTGAA	GCACAGGAC	AGCCAAATA	TGAATCTTAT	AGTCATAGAT	TAICICATAT	AGGACICAT
Variante II	AAATGAAAT	ACCACCTGAA	GCACAGGAC	AGCCAAATA	TGAATCTTAT	AGTCATAGAT	TAICICATAT	AGGACICAT
Variante III	AAATGAAAT	ACCACCTGAA	GCACAGGAC	AGCCAAATA	TGAATCTTAT	AGTCATAGAT	TAICICATAT	AGGACICAT
Variante IV	AAATGAAAT	ACCACCTGAA	GCACAGGAC	AGCCAAATA	TGAATCTTAT	AGTCATAGAT	TAICICATAT	AGGACICAT
Variante V	AAATGAAAT	ACCACCTGAA	GCACAGGAC	AGCCAAATA	TGAATCTTAT	AGTCATAGAT	TAICICATAT	AGGACICAT

	1445	1455	1465	1475	1485	1495	1505	1515
CEY11a12	TCAGCAATCAC	ATGTCGAAGC	ATTGGTATAT	TCTTGGACGC	AFCGTAGTGC	AGATCGTACA	ATAACAAATG	AGCCAAATAG
Variante I	TCAGCAATCAC	ATGTCGAAGC	ATTGGTATAT	TCTTGGACGC	AFCGTAGTGC	AGATCGTACA	ATAACAAATG	AGCCAAATAG
Variante II	TCAGCAATCAC	ATGTCGAAGC	ATTGGTATAT	TCTTGGACGC	AFCGTAGTGC	AGATCGTACA	ATAACAAATG	AGCCAAATAG
Variante III	TCAGCAATCAC	ATGTCGAAGC	ATTGGTATAT	TCTTGGACGC	AFCGTAGTGC	AGATCGTACA	ATAACAAATG	AGCCAAATAG
Variante IV	TCAGCAATCAC	ATGTCGAAGC	ATTGGTATAT	TCTTGGACGC	AFCGTAGTGC	AGATCGTACA	ATAACAAATG	AGCCAAATAG
Variante V	TCAGCAATCAC	ATGTCGAAGC	ATTGGTATAT	TCTTGGACGC	AFCGTAGTGC	AGATCGTACA	ATAACAAATG	AGCCAAATAG
	1525	1535	1545	1555	1565	1575	1585	1595
CEY11a12	CATTACACAA	ATACCATTAG	TAAAGCTTT	CAATCIGTCT	TCAGGTGCGG	CCTGATGAGG	AGGACCAGGA	TTTACAGGTG
Variante I	CATTACACAA	ATACCATTAG	TAAAGCTTT	CAATCIGTCT	TCAGGTGCGG	CCTGATGAGG	AGGACCAGGA	TTTACAGGTG
Variante II	CATTACACAA	ATACCATTAG	TAAAGCTTT	CAATCIGTCT	TCAGGTGCGG	CCTGATGAGG	AGGACCAGGA	TTTACAGGTG
Variante III	CATTACACAA	ATACCATTAG	TAAAGCTTT	CAATCIGTCT	TCAGGTGCGG	CCTGATGAGG	AGGACCAGGA	TTTACAGGTG
Variante IV	CATTACACAA	ATACCATTAG	TAAAGCTTT	CAATCIGTCT	TCAGGTGCGG	CCTGATGAGG	AGGACCAGGA	TTTACAGGTG
Variante V	CATTACACAA	ATACCATTAG	TAAAGCTTT	CAATCIGTCT	TCAGGTGCGG	CCTGATGAGG	AGGACCAGGA	TTTACAGGTG

	1605	1615	1625	1635	1645	1655	1665	1675
CGY11a12	GGGATATCCCTTCGAGAGAACGAAATACCTGGTA	CATTGGGGCA	TATAGGAGTA	AATATTATAC	CACCATTTCC	ACAAAGATAT		
Variante I	GGGATAICCTTCGAGAAGCCAAATCTGGTA	CATTGGGGCA	TATAGGAGTA	AATATTATAC	CACCATTTCC	ACAAAGATAT		
Variante II	GGGATATCCCTTCGAGAAGCCAAATCTGGTA	CATTGGGGCA	TATAGGAGTA	AATATTATAC	CACCATTTCC	ACAAAGATAT		
Variante III	GGGATATCCCTTCGAGAAGCCAAATCTGGTA	CATTGGGGCA	TATAGGAGTA	AATATTATAC	CACCATTTCC	ACAAAGATAT		
Variante IV	GGGATATCCCTTCGAGAAGCCAAATCTGGTA	CATTGGGGCA	TATAGGAGTA	AATATTATAC	CACCATTTCC	ACAAAGATAT		
Variante V	GGGATATCCCTTCGAGAAGCCAAATCTGGTA	CATTGGGGCA	TATAGGAGTA	AATATTATAC	CACCATTTCC	ACAAAGATAT		
	1685	1695	1705	1715	1725	1735	1745	1755
CGY11a12	CGGGTGAGGA	TTCGGCTAATG	TTCATACGAC	AAATATACGGT	AAAGCTATTA	ATCAAGGTTA		
Variante I	CGGGTGAGGA	TTCGGCTAATG	TTCATACGAC	AAATATACGGT	AAAGCTATTA	ATCAAGGTTA		
Variante II	CGGGTGAGGA	TTCGGCTAATG	TTCATACGAC	AAATATACGGT	AAAGCTATTA	ATCAAGGTTA		
Variante III	CGGGTGAGGA	TTCGGCTAATG	TTCATACGAC	AAATATACGGT	AAAGCTATTA	ATCAAGGTTA		
Variante IV	CGGGTGAGGA	TTCGGCTAATG	TTCATACGAC	AAATATACGGT	AAAGCTATTA	ATCAAGGTTA		
Variante V	CGGGTGAGGA	TTCGGCTAATG	TTCATACGAC	AAATATACGGT	AAAGCTATTA	ATCAAGGTTA		

	2085	2095	2105	2115	2125	2135	2145	2155
CPY1a12	ATGAAATTCIA	ICTTIGATGAA	ARGAGAGAA	TATTCGAGAT	AGTTAAATAC	GEGAGAGAAC	ICCAATATTA	GCGTAAACAIG
Variante I	ATGAAATTCIA	ICTTIGATGAA	ARGAGAGAA	TATTCGAGAT	AGTTAAATAC	GCGAGAGAAC	ICCAATATTA	GCGTAAACAIG
Variante II	ATGAAATTCIA	ICTTIGATGAA	ARGAGAGAA	TATTCGAGAT	AGTTAAATAC	GCGAGAGAAC	ICCAATATTA	GCGTAAACAIG
Variante III	ATGAAATTCIA	ICTTIGATGAA	ARGAGAGAA	TATTCGAGAT	AGTTAAATAC	GCGAGAGAAC	ICCAATATTA	GCGTAAACAIG
Variante IV	ATGAAATTCIA	ICTTIGATGAA	ARGAGAGAA	TATTCGAGAT	AGTTAAATAC	GCGAGAGAAC	ICCAATATTA	GCGTAAACAIG
Variante V	ATGAAATTCIA	ICTTIGATGAA	ARGAGAGAA	TATTCGAGAT	AGTTAAATAC	GCGAGAGAAC	ICCAATATTA	GCGTAAACAIG
CPY1a12								
Variante I								
Variante II								
Variante III								
Variante IV								
Variante V								

Fig. 3b