



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0616181-2 B1

(22) Data do Depósito: 15/09/2006

(45) Data de Concessão: 05/03/2024

(54) Título: CONSTRUÇÃO DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADA, SEQUÊNCIA DE RIBONUCLEOTÍDEO DE FITA DUPLA, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, E MÉTODOS PARA CONTROLE DE INFESTAÇÃO POR COLEÓPTERO PRAGA, PARA MELHORAR O RENDIMENTO E A TOLERÂNCIA A ESTIAGEM DE UM CULTIVO, E PARA PRODUÇÃO DE UM PRODUTO COMERCIAL, ALIMENTO OU RAÇÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; C07K 14/435.

(30) Prioridade Unionista: 16/09/2005 US 60/718,034.

(73) Titular(es): MONSANTO TECHNOLOGY LLC.

(72) Inventor(es): JAMES A. BAUM; CLAIRE A.CAJACOB; PASCALE FELDMANN; GREGORY R. HECK; IRENE NOOREN; GEERT PLAETINCK; TY T. VAUGHN; WENDY MADDELEIN.

(86) Pedido PCT: PCT US2006036319 de 15/09/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/035650 de 29/03/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/03/2008

(57) Resumo: MÉTODOS PARA CONTROLE GENÉTICO DE INFESTAÇÕES POR INSETOS EM PLANTAS E COMPOSIÇÕES DOS MESMOS. A presente invenção refere-se ao controle de infestação por pragas pela inibição de uma ou mais funções biológicas. A invenção provê métodos e composições para este controle, pela ingestão de uma ou mais das moléculas de RNA de filamento duplo recombinante, providas pela invenção, à dieta alimentar da praga reduz a sua infestação pela supressão de expressão gênica. A invenção destina-se também a métodos para produção de plantas transgênicas que expressam as moléculas de RNA de filamento duplo e a combinações especiais de agentes pesticidas transgênicos a serem utilizados na proteção de plantas contra infestação por pragas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"CONSTRUÇÃO DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADA, SEQUÊNCIA DE RIBONUCLEOTÍDEO DE FITA DUPLA, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, SEU MÉTODO DE PRODUÇÃO, E MÉTODOS PARA CONTROLE DE INFESTAÇÃO POR COLEÓPTERO PRAGA, PARA MELHORAR O RENDIMENTO E A TOLERÂNCIA A ESTIAGEM DE UM CULTIVO, E PARA PRODUÇÃO DE UM PRODUTO COMERCIAL, ALIMENTO OU RAÇÃO".

Incorporação por referência da listagem de sequências, submetida em disco compacto

[001] A Listagem de Sequências é submetida em um disco compacto (Cópia 1), juntamente com uma duplicata do mesmo (Cópia 2), ambos criados em 15 de setembro de 2006 e contendo um arquivo de 669 kb, intitulado "MNDE002.APP.TXT". O material contido no disco compacto é especificamente aqui incorporado por referência neste pedido de patente.

Reivindicação de Prioridade

[002] Este pedido reivindica a prioridade da Patente Provisória Número de Série US 60/718,034, depositada em 16 de setembro de 2005, cujo conteúdo é aqui incorporado, em sua totalidade, por referência neste pedido de patente.

Antecedentes da Invenção

1. Campo da Invenção

[003] A presente invenção se refere, de modo geral, ao controle genético de infestações por pragas. Mais especificamente, a presente invenção se refere a técnicas de DNA recombinante visando a repressão ou inibição de expressão pós-transcricional de sequências codificadoras, presentes na célula de uma praga, a fim de prover um efeito protetor contra a praga.

2. Descrição de Técnica Relacionada

[004] O ambiente no qual seres humanos vivem está repleto de infestação por pragas. A presença de pragas incluindo insetos, aracnídeos, crustáceos, fungos, bactérias, vírus, nematódeos, platelmintos, asquelmintos, oxiúros, áscaris, tênias, tripanossomos, esquistossomas, moscas dermatobias, carrapatos, ácaros e piolhos e similares é disseminada no ambiente humano. Uma pluralidade de métodos tem sido utilizada para tentar contro-lar infestações por estas pragas. Composições para controle de infestações por pragas microscópicas, como bactérias, fungos e vírus, foram providas sob a forma de composições antibióticas, composições antivirais e composições antifúngicas. Composições para controle de infestações por pragas de maior tamanho, como nematódeos, platelmintos, asquelmintos, oxiúros, áscaris, tênias, tripanossomos, esquistossomas e similares têm sido tipicamente sob a forma de composições químicas que podem ser aplicadas a superfícies sobre as quais as pragas estão presentes, ou administradas a animais infestados sob a forma de péletes, pós, comprimidos, pastas ou cápsulas e similares. Há uma grande necessidade na técnica para melhorar estes métodos e, especialmente, para métodos que trariam benefícios ao meio ambiente, em comparação a técnicas anteriores.

[005] Cultivos comerciais são freqüentemente os alvos de ataque por insetos. Um avanço relevante tem ocorrido nas últimas décadas, direcionado ao desenvolvimento de métodos e composições mais eficientes de controle de infestações em plantas. Pesticidas químicos têm sido muito eficientes na erradicação de infestações por pragas. No entanto, há várias desvantagens no uso de agentes pesticidas químicos. Agentes pesticidas químicos não são seletivos. Aplicações de pesticidas químicos, destinadas a controlar pragas invertebradas, como insetos coleópteros, incluindo espécies de larvas alfinete do milho, nocivas para vários tipos de cultivo e outras plantas, exercem

também efeito não pretendido sobre a fauna, freqüentemente esterilizando eficientemente um campo por um período de tempo acima daquele dos agentes pesticidas que foram aplicados. A presença de agentes pesticidas químicos persiste no meio ambiente, os quais, geralmente, são de lenta metabolização, se porventura o forem. Estes agentes acumulam-se na cadeia alimentar, especialmente nas espécies de predadores de maior tamanho. Os acúmulos destes agentes pesticidas químicos levam ao desenvolvimento de resistência aos agentes e em espécies de patamares evolutivos mais altos, podem atuar como mutagênicos e/ou carcinogênicos, provocando modificações genéticas irreversíveis e deletérias. Dessa forma, tem havido uma necessidade especial longamente sentida para métodos que não agridam o meio ambiente visando o controle ou erradicação de infestação por insetos sobre ou em plantas, ou seja, métodos seletivos, sem ação sobre meio ambiente, não persistentes e biodegradáveis e que se adaptem bem em esquemas de controle de resistência a pragas.

[006] Existem composições que incluem bactérias da espécie *Bacillus thuringiensis* (Bt) à disposição no mercado e estas têm sido utilizadas como inseticidas seguras para o meio ambiente e aceitáveis por mais de trinta anos. O efeito inseticida das bactérias Bt não persiste no meio ambiente, é altamente seletivo em relação às espécies afetadas às quais se destinam, sendo exercido somente quando estas são ingeridas por uma praga-alvo e, conforme demonstrado, não provocam danos a plantas e organismos aos quais não se destinam, incluindo seres humanos. Há disponíveis na técnica plantas transgênicas, contendo um ou mais genes que codificam a proteína inseticida da Bt, e estas são notadamente eficientes no controle de infestação provocada por insetos-praga. Um resultado relevante do uso de plantas recombinantes que expressam a proteína

inseticida da Bt é uma diminuição acentuada na quantidade de agentes pesticidas químicos, aplicados ao meio ambiente para controle de infestação por pragas, em campos de cultivos nos quais estas plantas transgênicas são utilizadas. A diminuição em aplicação de agentes pesticidas químicos resultou em solos mais limpos e água mais limpa escoando dos solos nos riachos vizinhos, rios, lagoas e lagos. Além desses benefícios ao meio ambiente, houve um aumento visível no número de insetos benéficos em campos de cultivos, nos quais plantas transgênicas resistentes a insetos são cultivadas, resultante do uso de agentes inseticidas químicos.

[007] Processos e composições antissenso têm sido expostos na técnica e acredita-se que exerçam os seus efeitos por intermédio da síntese de uma molécula de RNA de fita simples, a qual, em teoria, hibridiza-se in vivo para dar origem a uma molécula de RNA de fita senso, substancialmente complementar. O emprego da técnica antissenso tem sido difícil em muitos sistemas em decorrência de três motivos principais. Primeiramente, a sequência antissenso, expressa na célula transformada, é instável. Em segundo lugar, a instabilidade da sequência antissenso, expressa na célula transformada, torna difícil, concomitantemente, a liberação da sequência para um hospedeiro, tipo de célula ou sistema bio-lógico, distante da célula transgênica. Em terceiro lugar, as dificuldades encontradas com a instabilidade e liberação da sequência antissenso dificultam a determinação de uma dose, dentro da célula recombinante, que expresse a sequência antissenso, capaz de modular efetivamente o nível de expressão da sequência senso de nucleotídeos pretendida.

[008] Houve alguns aperfeiçoamentos em técnicas para modulação do nível de expressão gênica dentro de uma célula, tecido ou organismo, porém, há especialmente, carência de técnicas desenvolvidas para o retardamento, repressão ou, de outra forma, a

redução da expressão de genes específicos, utilizando a técnica de DNA recombinante. Ademais, em consequência de não ser possível prever os resultados dessas estratégias, não há meios comercialmente viáveis disponíveis para modulação do nível de expressão de um gene específico em organismo eucariótico ou procariótico.

[009] A inibição de genes específicos, mediada por RNA de fita dupla, em várias pragas foi previamente demonstrada. Abordagens para controle genético, mediado por dsRNA, foram testadas na mosca de frutas *Drosophila melanogaster* (Kennerdell e Carthew, 1998; Kennerdell e Carthew, 2000). Kennerdell e Carthew (1998) descreveram um método para liberação do dsRNA envolvido na geração de insetos transgênicos que expressam moléculas de RNA de fita dupla, ou injeções de soluções contendo dsRNA no corpo do inseto ou na ooteca, antes ou durante o desenvolvimento embrionário.

[0010] Pesquisadores demonstraram previamente que a supressão gênica mediada por RNA de fita dupla pode ser obtida em nematódeos, quer alimentando ou encharcando os nematódeos em soluções contendo moléculas de RNA de fita dupla ou moléculas de RNA pequeno interferente, e por injeção das moléculas de RNA. Rajagopal et. al. (2002) descreveram tentativas que falharam em suprimir um gene endógeno em larvas do inseto-praga *Spodoptera litura* pela alimentação ou submersão de larvas neonatas em soluções contendo dsRNA para o gene-alvo, porém obtiveram êxito, na supressão, depois que as larvas foram injetadas com dsRNA na hemolinfa do 5º instar das larvas, utilizando um microaplicador. Recentemente, Yadav et al. (2006) relataram que dsRNA, gerado por hospedeiro e produzido em uma planta, pode proteger estas plantas de infecção por nematódeos. Da mesma forma, o Pedido de Patente Publ. U.S. Nº 2003/0150017 expôs, profeticamente, um locus preferido

para inibição das larvas de lepidópteros *Helicoverpa armigera*, utilizando dsRNA liberado para as larvas por ingestão de uma planta transformada para produção do dsRNA. A WO 2005/110068 expõe o fornecimento, na dieta de larvas alfinete de milho (CRW), de dsRNA específico da CRW, direcionado para genes fundamentais da CRW. O dsRNA é fornecido na dieta do CRW, in vitro e in planta, resultando em atrofia ou morte de larvas de CRW, após serem alimentadas com a dieta, tendo esse efeito sido demonstrado para vários genes diferentes.

[0011] Por conseguinte, há necessidade para identificação de seqüências eficazes de nucleotídeos que possam ser utilizadas em métodos aperfeiçoados de modulação de expressão gênica, pela repressão, retardo ou, de outra forma, redução de expressão gênica, dentro de um coleóptero-praga em particular, visando o controle de infestação por praga ou a introdução de novos traços fenotípicos.

Sumário da Invenção

[0012] Em uma característica, a invenção provê um método de inibição de expressão de um gene-alvo em coleópteros-praga. Em certas concretizações, o método compreende a modulação ou inibição da expressão de um ou mais genes-alvo em coleóptero-praga que faz com que este pare de se alimentar, crescer, desenvolver, reproduzir e/ou perca a sua capacidade de infectar e, eventualmente, resulta na morte do inseto. O método compreende introdução de RNA de fita dupla (dsRNA) estabilizado, parcial ou completo, incluindo suas formas modificadas, como sequências de pequeno RNA interferente (siRNA), nas células ou no ambiente extracelular, como o intestino médio no corpo de um coleóptero-praga, em que o RNA penetra as células e inibe a expressão de, pelo menos, um ou mais genes-alvo e, em que, a inibição exerce um efeito deletério sobre o coleóptero-praga. Os métodos e composições associadas podem ser utilizados

para restringir ou eliminar infestação por coleóptero-praga em ou sobre qualquer hospedeiro ou simbiote da praga ou no ambiente no qual uma praga esteja presente, pelo fornecimento de uma ou mais composições, compostas pelas moléculas de dsRNA, expostas neste pedido, na dieta da praga. O método trará benefícios especialmente à proteção de plantas contra-ataques por insetos. Em uma concretização, a praga é definida como compreendendo um pH do sistema digestivo incluído no intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,5, de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente pH 7,0.

[0013] Em outra característica, a presente invenção provê composições exemplares de ácidos nucleicos, homólogas a, pelo menos, uma parte de uma ou mais sequências nativas de ácidos nucleicos, em uma praga-alvo. Em certas concretizações, a praga é selecionada entre *Diabrotica* sp., incluindo larva alfinete do milho ocidental (WCR, *Diabrotica virgifera* ou *Diabrotica virgifera virgifera*), Larva alfinete do milho do Sul (SCR, *Diabrotica undecimpunctata howardi*), Larva Alfinete do Milho do México (MCR, *Diabrotica virgifera zea*), Larva Alfinete do Milho do Brasil (BZR, *Diabrotica balteata*, *Diabrotica viridula*, *Diabrotica speciosa*), Larva Alfinete do Milho do Norte (NCR, *Diabrotica barberi*), *Diabrotica undecimpunctata*; bem como o Besouro da Batata do Colorado (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*), Besouro-Vermelho de Farinha (RFB, *Tribolium castaneum*) e Besouro do Feijão Mexicano (*Epilachna varivestis*). Em outras concretizações, a praga é selecionada entre insetos lepidópteros, incluindo Broca de Milho Europeu (ECB, *Ostrinia nubilalis*), Gafanhoto Preto (BCW, *Agrotis ipsilon*), Lagarta da Espiga de Milho (CEW, *Helicoverpa zea*), Lagarta-do-Cartucho (FAW, *Spodoptera frugiperda*), Bicudo-do-algodeiro (BWV, *Anthonomus*

grandis), bichos da seda (*Bombyx mori*) e *Manduca sexta*, e de insetos dípteros, incluindo *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* e *Aedes aegypti*. Exemplos específicos destes ácidos nucleicos, providos pela invenção, são fornecidos na listagem de sequências anexa, indicados pelas SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906.

[0014] Em ainda uma outra característica, a invenção provê um método para supressão de expressão gênica em um coleóptero-praga, como larva alfinete de milho ou espécie correlata, que compreende a etapa de fornecimento na dieta da praga de uma quantidade supressora do gene, contando com pelo menos uma molécula de dsRNA, transcrita de uma sequência de nucleotídeos, conforme descrita neste pedido, que tenha pelo menos um fragmento complementar de uma sequência do mRNA no interior das células da praga. O método pode compreender ainda a observação da morte, inibição, atrofia ou interrupção de alimentação da praga. Uma molécula de dsRNA, incluindo a sua forma modificada, alimentada à praga, de acordo com a invenção, pode ser, pelo menos, aproximadamente 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou aproximadamente 100% idêntica a uma molécula de RNA, transcrita de uma sequência de nucleotídeos, selecionada do grupo constituído pela SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906. Em concretizações especiais, a sequência de nucleotídeos pode ser selecionada do grupo constituído pela SEQ ID NO: 697, SEQ ID NOs: 813-819, SEQ ID NO: 841 e SEQ ID NO: 874.

[0015] De acordo com o mesmo, em outra característica da presente invenção, é provido um conjunto de sequências de nucleotídeos, isoladas e purificadas, conforme indicadas na SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906. A presente invenção provê uma molécula de dsRNA estabilizada ou a expressão de um ou mais miRNAs para inibição da expressão de um gene-alvo, em coleóptero-praga,

expressado destas sequências e fragmentos das mesmas. O dsRNA estabilizado, o qual inclui uma molécula de miRNA ou de siRNA, pode compreender pelo menos duas sequências codificadoras, arranjadas em orientação sentido e antissenso, em relação a, pelo menos, um promotor, em que a sequência de nucleotídeos, compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, está unida ou ligada a uma sequência espaçadora, contando com, pelo menos, aproximadamente cinco a aproximadamente mil nucleotídeos, em que a fita senso e a fita antissenso podem ser de comprimento diferente, e em que as duas sequências codificadoras compartilham, pelo menos, 80% de identidade de sequência, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou 100% de identidade de sequência, em relação a uma ou mais sequências de nucleotídeos, indicadas na SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906.

[0016] Ainda é provido pela invenção, um fragmento ou concatâmero de uma sequência de ácido nucléico, selecionada do grupo constituído pela SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906. Em concretizações especiais, a sequência de nucleotídeos pode compreender um fragmento ou concatâmero de uma sequência selecionada do grupo constituído pela SEQ ID NO: 697, SEQ ID NOs: 813-819, SEQ ID NO: 841 e SEQ ID NO: 874.

[0017] O fragmento pode ser definido como causador da morte, inibição, atrofia ou interrupção de alimentação de uma praga, quando expresso sob a forma de dsRNA e provido à praga. O fragmento pode compreender, por exemplo, pelo menos, aproximadamente 19, 21, 23, 25, 40, 60, 80, 100, 125 ou mais nucleotídeos contíguos de qualquer uma ou mais das seqüências indicadas pela SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou um complemento destas. Um segmento de DNA proveitoso para uso na presente invenção contém, pelo menos, de aproximadamente 19 a aproximadamente 23, ou de aproximadamente

23 a aproximadamente 100 nucleotídeos até aproximadamente 2000 nucleotídeos ou mais, em extensão. Serão especialmente proveitosas sequências de dsRNA incluindo de aproximadamente 23 a aproximadamente 300 nucleotídeos, homólogas da sequência de uma praga-alvo. A invenção provê também um ácido ribonucléico expresso por qualquer uma destas sequências, incluindo um dsRNA. Uma sequência, cujo uso pode ser selecionado para expressão de um agente supressor do gene, pode ser construída a partir de uma única sequência, derivada de uma ou mais pragas-alvo, e cujo uso destina-se à expressão de um RNA que atue na supressão de um único gene ou família de genes em uma ou mais das pragas-alvo, ou que a sequência de DNA possa ser construída sob a forma de quimera, proveniente de uma pluralidade de sequências de DNA.

[0018] Em ainda outra característica, a invenção provê constructos de DNA recombinantes, compreendendo uma molécula de ácido nucléico que codifica uma molécula de dsRNA, descrita neste pedido. O dsRNA pode ser formado por transcrição de uma fita da molécula de dsRNA com sequência de nucleotídeos, aproximadamente 80% a aproximadamente 100% idêntica a uma sequência de nucleotídeos, selecionada do grupo constituído pela SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906. Estes constructos de DNA re-combinante podem ser definidos como produtores de moléculas de dsRNA, capazes de inibir a expressão de gene(s) endógeno(s) visado(s) em uma célula de praga, ao serem ingeridas. O constructo pode conter uma sequência de nucleotídeos da invenção, operacionalmente ligada a uma sequência de promotor que atue na célula do hospedeiro. Este promotor pode ser específico de tecidos e pode, por exemplo, ser específico para um tecido, objeto de ataque da praga. No caso de larvas alfinete, por exemplo, pode-se de-sejar utilizar um promotor que se expresse de preferência em raízes.

[0019] Constructos de ácido nucléico de acordo com a invenção po-dem compreender pelo menos uma sequência de nucleotídeos que não ocorra naturalmente e que possa ser transcrita em RNA de fita simples, capaz de formar uma molécula de dsRNA in vivo por hibridização. Estas sequências de dsRNA montam-se sozinhas e podem ser fornecidas na dieta de um coleóptero-praga de forma a ser obtida a inibição desejada.

[0020] Um constructo de DNA recombinante pode compreender duas sequências diferentes que não ocorram naturalmente, as quais, quando expressas in vivo sob a forma de sequências de dsRNA e fornecidas na di-eta de um coleóptero-praga, inibem a expressão de, pelo menos, dois ge-nes-alvo diferentes na célula do coleóptero-alvo. Em certas concretizações, pelo menos 3, 4, 5, 6, 8, 10 ou mais dsRNA diferentes são produzidos em uma célula ou planta que compreenda a planta que possui efeito inibidor sobre a praga. Os dsRNAs podem ser expressos a partir de múltiplos cons-tractos, introduzidos em eventos diferentes de transformação, ou podem ser introduzidos em uma única molécula de ácido nucléico. Os dsRNAs podem ser expressos utilizando um único promotor ou promotores múltiplos. Em uma concretização da invenção, são produzidos dsRNAs simples compreendendo homólogos de ácidos nucléicos para locos múltiplos dentro de uma praga.

[0021] Em ainda outra característica, a invenção provê uma célula re-combinante do hospedeiro, contendo em seu genoma, pelo menos, uma sequência de DNA recombinante, a qual é transcrita para produzir, pelo menos, uma célula de dsRNA que atue quando ingerida por um coleóptero-praga, de forma a inibir a expressão de um gene-alvo na praga. A molécula de dsRNA pode ser codificada pelos ácidos nucléicos, descritos no presen-te, e conforme indicados na listagem de sequências. A presente invenção provê também uma célula vegetal

transformada, contendo em seu genoma, pelo menos, uma sequência de DNA recombinante, descrita neste pedido. Plantas transgênicas compreendendo esta célula vegetal transformada são providas também, incluindo plantas de progênie de qualquer geração, sementes e produtos de plantas, todos compreendendo o DNA recombinante.

[0022] Os métodos e composições da presente invenção podem ser aplicados a qualquer planta monocotiledônea ou dicotiledônea, dependendo do controle de coleóptero-praga desejado. Especificamente, as plantas pretendem incluir, entre outras, plantas de alfafa, endro, maçã, abricó, alca-chofra, rúcula, aspargo, abacate, banana, cevada, favas, beterraba, amora silvestre, mirtilo, brócolis, couve-de-bruxelas, repolho, canola, melão cantaloupe, cenoura, mandioca, couve-flor, aipo, cereja, coentro, cítricos, tangerina, café, milho, algodão, pepino, pseudotsuga, berinjela, endívia, escarola, eucalipto, funcho, figo, cabaça, uva, toranja, melão "honey dew", batata mexicana (jicama), kiwi, alface, alho-poró, limão, lima, pinheiro loblolly, manga, melão, cogumelo, noz, aveia, quiabo, cebola, laranja, planta ornamental, mamão papaia, salsa, ervilha, pêssego, amendoim, pêra, pimenta, caqui, pinheiro, abacaxi, plátano, ameixa, romã, álamo, batata, abóbora, marmelo, pinheiro radiata, chicória, rabanete, framboesa, arroz, centeio, sorgo, pinheiro do sul, soja, espinafre, abóbora "squash", morango, beterraba sacarina, cana-de-açúcar, girassol, batata-doce, liquidambar, tangerina, chá, tabaco, tomate, grama, vinha, melancia, trigo, inhame e de abobrinha. Dessa forma, uma planta transformada com uma sequência de DNA recombinante, conforme indicada na SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou concatâmero, fragmento ou complemento destas, transcrita para produzir, pelo menos, uma molécula de dsRNA que atue, quando ingerida por um coleóptero-praga, na inibição da expressão de um

gene-alvo, é provida também pela invenção. Em concretizações especiais, a sequência de DNA recombinada pode ser selecionada do grupo constituído pela of SEQ ID NO: 697, SEQ ID NOs: 813-819, SEQ ID NO: 841 e SEQ ID NO: 874, ou fragmento, complemento ou concatâmero destas.

[0023] A invenção provê também combinações de métodos e composições para controle de infestações por coleóptero-praga. Um dos meios pro-vidos se refere ao uso de dsRNA, conforme descrito neste pedido, para pro-teção de plantas contra infecção por insetos, juntamente com um ou mais agentes inseticidas com características diferentes daquelas exibidas pelos métodos com dsRNA e composições. Por exemplo, uma ou mais proteínas de Bt podem ser fornecidas na dieta de insetos-praga, em combinação com um ou mais dsRNAs, conforme expostos no presente. Uma composição formulada para aplicação tópica ou derivada, empregando uma abordagem transgênica que combine métodos com dsRNA e composições com Bt, pode ser utilizada de forma a conferir sinergias que não eram conhecidas previ-amente na técnica. Um dos efeitos sinérgicos resultantes é a redução no nível de expressão exigido para o(s) dsRNA(s) ou proteína(s) da Bt. Quando combinados, uma dose efetiva mais baixa de cada agente de controle da praga poderia ser utilizada. Acredita-se que as proteínas inseticidas da Bt criam poros que possibilitam a penetração das moléculas do dsRNA com mais eficiência em espaços remotos do intestino de insetos-praga, ou com mais eficiência nas células próximas a lesões criadas pelas proteínas da Bt, requerendo, dessa forma, menos quantidade de Bt ou do dsRNA para se obter o resultado inseticida desejado ou para a inibição ou supressão dese-jada de uma função biológica visada na praga à qual se destina.

[0024] A presente invenção provê, por conseguinte, uma

composição que contém mais dois agentes pesticidas diferentes, todos tóxicos para a mesma praga ou espécie de inseto, pelo menos um destes compreendendo um dsRNA exposto neste pedido. Em certas concretizações, o segundo agente pode ser um agente selecionado do grupo constituído por uma pata-tina, uma proteína inseticida do *Bacillus thuringiensis*, uma proteína inseticida do *Xenorhabdus*, uma proteína inseticida do *Photorhabdus*, uma proteína inseticida do *Bacillus laterosporous*, uma proteína inseticida do *Bacillus sphaericus* e uma lignina. Esta proteína inseticida do *Bacillus thuringiensis* pode ser qualquer uma entre algumas proteínas inseticidas, incluindo, entre outras, Cry1, Cry3, TIC851, CryET70, Cry22, TIC901, TIC1201, TIC407, TIC417, uma proteína inseticida binária CryET33 e CryET34, uma proteína inseticida binária CryET80 e CryET76, uma proteína inseticida binária TIC100 e TIC101, uma proteína inseticida binária PS149B1, uma proteína inseticida VIP, TIC900 ou proteína correlata, ou combinações das proteínas inseticidas ET29 ou ET37 com as proteínas inseticidas TIC810 ou TIC812, e quimeras inseticidas de qualquer uma das proteínas inseticidas precedentes.

[0025] Ácido ribonucléico presente em dieta pode ser fornecido em uma dieta artificial, formulada para atender a requisitos nutritivos especiais que mantenham uma praga nesta dieta. A dieta pode ser complementada com uma quantidade, que controle a praga, de RNA, purificado a partir de um sistema de expressão diferente para que possa ser determinada uma quantidade de controle de praga de uma composição de RNA ou para determinar a extensão da atividade supressora na ingestão da dieta complementada pela praga. A dieta pode conter também uma célula transformada recombinante com sequência de DNA, construída para expressão do agente, de RNA ou do agente de supressão do gene. Na ingestão, pela praga, de uma ou mais destas células transformadas, é observado um resultado feno-

típico desejado, indicando que o agente atuou na inibição da expressão de uma sequência visada de nucleotídeos, presente nas células da praga.

[0026] Um gene, cuja supressão é visada, pode codificar uma proteína essencial cuja função prevista é selecionada do grupo constituído por formação de músculos, formação de hormônio juvenil, regulação de hormônio juvenil, regulação e transporte de íons, síntese de enzima digestiva, manutenção de potencial de membrana celular, biossíntese de aminoácidos, degradação de aminoácidos, formação de esperma, síntese de feromônio, formação de antena, formação de asa, formação de perna, desenvolvimento e diferenciação, formação de ovo, maturação larval, formação de enzima digestiva, síntese de hemolinfa, manutenção de hemolinfa, neurotransmissão, divisão celular, metabolismo energético, função desconhecida e apoptose.

[0027] Outra característica da presente invenção provê também métodos para melhorar o rendimento de uma cultura de uma planta de cultivo, sujeita à infestação por inseto-praga, o referido método compreendendo as etapas de (a) introdução de um polinucleotídeo contendo uma sequência selecionada entre a SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou um complemento, concatêmero ou fragmento destas na referida planta de cultivo; e (b) o cultivo desta planta de forma a permitir a expressão do referido polinucleotídeo, em que a expressão do polinucleotídeo inibe a alimentação por insetos-praga e a perda de rendimento decorrente de infestação por praga.

[0028] Em certas concretizações, a expressão do polinucleotídeo produz uma molécula de RNA que suprime, pelo menos, um primeiro gene-alvo, em inseto-praga que tenha ingerido uma porção da referida planta de cultivo, em que o gene-alvo atua em, pelo menos, uma função essencial selecionada do grupo constituído por alimentação pela praga, viabilidade da praga, apoptose celular da praga,

diferenciação e desenvolvimento da praga ou de qualquer célula da praga, reprodução sexual pela praga, formação de músculo, movimentação muscular, contração muscular, formação e/ou redução de hormônio juvenil, regulação de hormônio juvenil, regulação e transporte de íons, manutenção de potencial da membrana celular, biossíntese de aminoácidos, degradação de aminoácidos, formação de esperma, síntese de feromônio, sensibilidade de feromônio, formação de antena, formação de asas, formação de perna, formação de ovo, maturação larval, formação de enzima digestiva, síntese de hemolinfa, manutenção de hemolinfa, neurotransmissão, transição de estágio larval, pupação, emergência de pupação, divisão celular, metabolismo energético, respiração e síntese e manutenção de estrutura citoesquelética, metabolismo de nucleotídeos, metabolismo de nitrogênio, uso de água, retenção hídrica e percepção sensorial.

[0029] Em outras concretizações, o inseto-praga é uma praga de larva alfinete de milho, selecionada do grupo constituído por *Diabrotica undecim-punctata howardi* (larva alfinete do milho do Sul (SCR)), *Diabrotica virgifera virgifera* (larva alfinete do milho ocidental (WCR)), *Diabrotica barberi* (larva alfinete do milho do Norte (NCR)), *Diabrotica virgifera zea* (Mexican Corn Rootworm (MCR)), *Diabrotica balteata* (Brazilian Corn Rootworm (BZR)), *Diabrotica viridula* (Brazilian Corn Rootworm (BZR)) e *Diabrotica speciosa* (Brazilian Corn Rootworm (BZR)).

[0030] São fornecidos também métodos para melhora de tolerância à estiagem de um cultivar, resultante de uma planta de cultivo sujeita à infestação por inseto-praga, o referido método compreendendo as etapas de (a) introdução de uma sequência de polinucleotídeo, selecionada entre a SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou fragmento da mesma, na referida planta de cultivo; e (b) cultura da planta de cultivo de forma a permitir a expressão do referido

polinucleotídeo, em que a expressão deste inibe a alimentação pe-los insetos-praga e a perda da tolerância à estiagem decorrente da infesta-ção por praga.

[0031] Outra característica da invenção provê ainda produtos e/ou composições de matéria de valor agrônômico e comercial, incluindo, entre outros, produtos e subprodutos cujo uso pretendido é alimento de consumo humano ou para uso em composições e produtos comerciáveis pretendidos para consumo humano, incluindo, entre outros, farinha de milho, alimento de milho, xarope de milho, óleo de milho, amido de milho, pipoca, bolos de milho, cereais e similares. Estas composições podem ser definidas como contendo quantidades detectáveis de uma sequência de nucleotídeos, ex-posta neste pedido, servindo também, dessa forma, para diagnóstico de qualquer evento transgênico contendo estas sequências de nucleotídeos. Estes produtos são úteis, no mínimo, por serem possivelmente derivados de plantas cultivadas com menos pesticidas e organofosfatos, graças à incor-poração dos nucleotídeos da presente invenção para controle de infestação de coleópteros-praga em plantas. Estes produtos e derivados comerciáveis podem ser produzidos a partir de semente proveniente de planta transgêni-ca, em que a planta transgênica expressa RNA de um ou mais nucleotídeos contíguos da presente invenção, ou nucleotídeos de um ou mais coleópte-ros-praga e os complementos destes. Estes produtos e derivados comerciá-veis podem ser úteis também no controle de coleópteros-praga, presentes nestes produtos e derivados comerciáveis, como, por exemplo, controle de gorgulhos de farinha, em virtude de haver, no produto ou derivado comerci-ável, o RNA supressor do gene, expresso a partir de uma sequência gênica, conforme descrita na presente invenção.

[0032] É provido também método de produção deste produto comerciá-vel, compreendendo a obtenção de uma planta transformada

com um poli-nucleotídeo contendo uma sequência selecionada do grupo constituído pe-la SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou concatâmero, fragmento ou com-plemento desta, e o preparo de um produto comerciável da planta ou de par-te da mesma. Ademais, é ainda uma outra característica da invenção, um método de produção de comida ou alimento, compreendendo a obtenção de uma planta transformada com um polinucleotídeo contendo uma sequência selecionada do grupo constituído pela SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou fragmento ou complemento desta, e o preparo de comida ou alimento a partir da referida planta ou de parte da mesma.

[0033] A invenção provê também um meio que pode ser lido por com-putador, contendo os registros de uma ou mais sequências de nucleotídeos, conforme indicadas na SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou complemen-tos destas, para uso em alguns aplicativos em computador, incluindo, entre outros, pesquisa de identidade e semelhança de DNA, caracterizações de perfis de transcrição, comparações entre genomas e análises de hibridiza-ção artificial.

Breve Descrição das Figuras

[0034] Figura 1: Bioensaio de eventos de planta de milho F1, transfor-mada com pMON98503 (SEQ ID NO: 820) e submetida a testes com Larva Alfinete Ocidental (larva alfinete do milho ocidental (WCR)).

[0035] Figura 2: Bioensaio de eventos de planta de milho F1, transfor-mada com pMON98504, contendo o concatâmero C1 (SEQ ID NO: 821) e submetida a testes com Larva Alfinete Ocidental (larva alfinete do milho oci-dental (WCR)).

[0036] Figura 3: Seleção de fragmentos Dv49 e Dv248 e desenho es-quemático do concatâmero C38 de Dv49-Dv248.

[0037] Figura 4: dsRNAs F1-F13, sintetizados com base no concatâme-ro C38.

[0038] Figura 5: Dose-resposta ao concatâmero 38 de DV49-DV248 (Fragmentos F1-F6).

[0039] Figura 6: Dose-resposta ao concatâmero 38 de DV49-DV248 (Fragmentos F7-F10).

[0040] Figura 7: Dose-resposta ao concatâmero 38 de DV49-DV248 (Fragmentos F11-F13).

Descrição Detalhada da Invenção

[0041] A seguir, é apresentada uma descrição detalhada da invenção, fornecida para auxiliar a sua prática por versados na técnica. Qualquer ver-sado na técnica pode modificar ou variar as concretizações aqui descritas, sem se distanciar do espírito ou escopo da presente invenção.

[0042] A presente invenção provê métodos e composições para contro-le genético de infestações por praga. Por exemplo, ela provê técnicas de DNA recombinante visando reprimir ou inibir a expressão pós-transcricional de uma sequência codificadora-alvo, na célula de uma praga, a fim de ser conferido efeito de proteção contra a praga, pela alimentação à mesma de uma ou mais moléculas de ácido ribonucléico (RNA) de fita dupla ou pequeno interferente, transcrito de toda ou de parte de uma sequência codificadora-alvo e o controle, pelo mesmo, da infestação. Por conseguinte, a presente invenção se refere à inibição específica de sequência de expressão de sequências codificadoras, empregando RNA de fita dupla (dsRNA), inclusive pequeno RNA interferente (siRNA), para serem atingidos os níveis pretendidos de controle.

[0043] São providas moléculas de ácido nucléico, isoladas e substancialmente purificadas, incluindo, porém sem restrição, sequências de nucleotídeos que não ocorrem naturalmente e constructos de DNA recombinante que suprimem ou inibem a expressão de uma sequência codificadora endógena na praga, quando

introduzidas nesta. São providas também plantas transgênicas que (a) contêm sequências de nucleotídeos que codificam as moléculas de ácido nucléico, isoladas e substancialmente purificadas, e os constructos de DNA que não ocorrem naturalmente para transcrição das moléculas de dsRNA visando o controle de infestações de plantas por pragas, e que (b) exibem resistência e/ou tolerância intensificadas às infestações por insetos. São descritas também composições contendo as seqüências de nucleotídeos de dsRNA da presente invenção para uso em aplicações tóxicas em plantas ou animais, ou no ambiente de um animal, visando eliminar ou reduzir infestação por praga.

[0044] Os inventores descobriram que, ao contrário dos ensinamentos na técnica anterior, a alimentação de uma composição contendo RNA de fita dupla, cuja molécula consiste em sequências com uma ou mais sequências expressas de nucleotídeos de uma espécie de coleóptero às espécies das quais as sequências de nucleotídeos foram obtidas, resulta na inibição de uma ou mais funções biológicas na espécie de coleóptero. Os inventores descobriram, especialmente, que a alimentação de moléculas de fita dupla, descritas neste pedido, a espécies de pragas de plantas de cultivo, como larvas alfinete de milho, resulta na morte ou inibição de desenvolvimento e diferenciação de insetos-praga que ingeriram estas composições.

[0045] Os inventores identificaram que as sequências de nucleotídeos, aqui descritas, conferem efeitos protetores à planta contra espécies de coleópteros-praga. Foram deduzidas sequências de aminoácidos, codificadas pelas sequências de cDNA, e estas foram comparadas a sequências de aminoácidos conhecidas. Prevê-se que muitas destas sequências codificam proteínas que possuem alguma informação anotada, associada às mesmas. A informação anotada,

associada a uma sequência de nucleotídeo em particular e sequência de proteína, codificada da mesma, tem como base homologia ou semelhança entre as sequências de aminoácidos, deduzidas através da tradução das sequências de codificação aqui descritas, conforme apresentadas, e sequências de aminoácidos, conhecidas na técnica e que podem ser encontradas em bancos de dados públicos.

[0046] Sequências de cDNA que codificam proteínas ou partes de proteínas, fundamentais para sobrevivência, como sequências de aminoácidos, envolvidas em várias vias bioquímicas metabólicas ou catabólicas, divisão celular, reprodução, metabolismo energético, digestão, função neurológica e funções similares, foram selecionadas para serem utilizadas no preparo de moléculas de RNA de fita dupla, sendo estas fornecidas na dieta de coleópteros-praga. Conforme descrito neste pedido, ingestão, por uma praga-alvo, de composições contendo um ou mais dsRNAs, com pelo menos um segmento que corresponda a pelo menos um segmento substancialmente idêntico do RNA produzido nas células da praga-alvo, resultou em morte, atrofia ou outro tipo de inibição da praga-alvo. Esses resultados indicaram que uma sequência de nucleotídeos de DNA ou RNA, derivada de um coleóptero-praga, pode ser utilizada para construir células de plantas resistentes à infestação pela praga. O hospedeiro da praga pode, por exemplo, ser transformado de forma a conter uma ou mais das sequências de nucleotídeos, derivadas do coleóptero-praga. A sequência transformada de nucleotídeos no hospedeiro ou simbiote da praga pode codificar um ou mais RNAs que formam uma sequência de dsRNA nas células ou líquidos biológicos dentro do hospedeiro ou simbiote transformado, disponibilizando, dessa forma, os dsRNA na dieta da praga, se/quando a praga alimentar-se do hospedeiro ou simbiote transgênico, resultando na supressão da expressão de um ou mais genes, nas células da praga, e, em última instância, na

morte, atrofia ou outro tipo de inibição da praga.

[0047] A presente invenção se refere, de modo geral, ao controle genético de infestações por coleópteros-praga em organismos hospedeiros. A presente invenção inclui, mais especialmente, os métodos de liberação de agentes de controle de pragas a um coleóptero-praga. Estes agentes de controle de pragas comprometem, quer direta ou indiretamente, a capacidade da praga de manter-se, crescer ou, de outra forma, infestar um hospedeiro ou simbiote visado. A presente invenção provê métodos para o emprego de moléculas estabilizadas de dsRNA na dieta da praga, como uma maneira para supressão de genes específicos na praga e, dessa forma, ser atingido o controle desejado de infestações por pragas em ou em torno do hospedeiro ou simbiote visado pela praga.

[0048] Para atingir o precedente, a presente invenção provê um método de inibição de expressão de um gene-alvo em coleóptero-praga, incluindo, por exemplo, larvas alfinete de milho ou outras espécies de insetos coleópteros, resultando na interrupção de alimentação, crescimento, desenvolvimento, reprodução, capacidade de infectar e podendo, eventualmente, resultar na morte da praga. O método compreende, em uma concretização, a introdução parcial ou completa de moléculas estabilizadas de nucleotídeos de RNA de dupla fita (dsRNA) em uma composição nutritiva na qual a praga baseia-se como fonte de alimento, e disponibilização da composição nutritiva para alimentação da praga. A ingestão da composição nutritiva, contendo as moléculas de RNA de dupla fita ou de siRNA, resulta na absorção das moléculas pelas células da praga, levando à inibição da expressão de, pelo menos, um gene-alvo em suas células. A inibição do gene-alvo exerce um efeito deletério sobre a praga.

[0049] Em certas concretizações, as moléculas de dsRNA, providas pela invenção, compreendem sequências de nucleotídeos

complementares de uma sequência conforme indicada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, cuja inibição, em organismo de praga, resulta na re-dução ou remoção do agente de uma proteína ou sequência de nucleotí-deos, essencial para o crescimento e desenvolvimento ou para outra função biológica das pragas. A sequência de nucleotídeos selecionada pode exibir de aproximadamente 80% a, pelo menos, aproximadamente 100% de iden-tidade de sequência em relação a uma das sequências de nucleotídeos, conforme indicadas na SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, de acordo com a listagem das sequências, incluindo o complemento das mesmas. Esta inibi-ção pode ser descrita como específica em que é escolhida uma sequência de nucleotídeos de uma parte do gene-alvo, do qual o dsRNA ou siRNA é transcrito. O método efetivamente inibe a expressão de, pelo menos, um ge-ne-alvo e pode ser utilizado para inibir muitos tipos diferentes de genes-alvo na praga. Em concretizações especiais, a sequência de nucleotídeos pode ser selecionada do grupo constituído pela SEQ ID NO: 697, SEQ ID NOs: 813-819, SEQ ID NO: 841 e SEQ ID NO: 874.

[0050] As sequências identificadas como tendo efeito protetor contra praga podem ser expressas de imediato como moléculas de dsRNA pela criação de constructos apropriados de expressão. Por exemplo, estas se-qüências podem ser expressas sob a forma de grampo e de alça, tomando-se um primeiro segmento, correspondente a uma sequência selecionada SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou um fragmento desta, ligando-se esta sequência a um segundo segmento de região espaçadora, o qual não é homólogo ou complementar ao primeiro segmento, e ligando-se este a um terceiro segmento que transcreve um RNA, em que pelo menos uma parte do terceiro segmento é substancialmente complementar do primeiro segmento. Este constructo forma uma estrutura em laço por hibridização

do primeiro segmento com o terceiro segmento e formação de estrutura em alça compreendendo o segundo segmento (WO94/01550, WO98/05770, US 2002/0048814A1 e US 2003/0018993A1).

A. Composições e construções de ácidos nucléicos

[0051] A invenção provê constructos de DNA recombinante para serem utilizados a fim de ser obtida transformação estável de hospedeiros ou sim-biontes de pragas, visados em particular. Os hospedeiros ou simbiontes transformados visados de pragas podem expressar níveis pesticidas efetivos de moléculas preferidas de dsRNA ou de siRNA, provenientes de construc-tos de DNA recombinante, e as moléculas fornecidas na dieta da praga. Pa-res de sequências de nucleotídeos, isoladas e purificadas, podem ser provi-das, provenientes de biblioteca de cDNA e/ou informação genômica de bi-bliotecas. Os pares de sequências de nucleotídeos podem ser derivados de qualquer coleóptero-praga preferido para uso como iniciadores de amplifi-cação térmica a fim de gerar cópias de DNA para o preparo de moléculas de dsRNA e de siRNA da presente invenção.

[0052] Conforme utilizado no presente, o termo "ácido nucléico" se refere a um polímero de fita simples ou dupla de bases de desoxirribonu-cleotídeos ou ribonucleotídeos, cuja leitura inicia na extremidade 5' até a extremidade 3'. O "ácido nucléico" pode conter também, opcionalmente, ba-ses de nucleotídeos que não ocorrem naturalmente ou alteradas que permi-tam a leitura correta por uma polimerase e que não reduzam a expressão de um polipeptídeo codificado por aquele ácido nucléico. O termo "sequência de nucleotídeos" ou "sequência de ácido nucléico" se refere a fitas em orientação sendo e antissenso de um ácido nucléico, sob a forma de fitas simples individualizadas ou na forma de dúplex. O termo "ácido ribonucléico" (RNA) inclui RNAi (RNA inibidor), dsRNA (RNA de fita

dupla), siRNA (pequeno RNA interferente), mRNA (RNA mensageiro), miRNA (micro-RNA), tRNA (RNA de transferência, com carga ou sem carga com um aminoácido acilado correspondente) e cRNA (RNA complementar), e o termo "ácido desoxirribonucléico" (DNA) inclui cDNA e DNA genômico e híbridos DNA-RNA. As palavras "segmento de ácido nucléico", "segmento de sequência de nucleotídeos" ou, mais generalizada, "segmento" serão entendidas por aqueles na técnica como um termo funcional que inclui sequências genômicas, sequências de RNA ribossômico, sequências de RNA de transferência, sequências de RNA mensageiro, sequências de operon e sequências menores construídas de nucleotídeos que expressam, ou que podem ser adaptadas para expressar, proteínas, polipeptídeos ou peptídeos.

[0053] São providas, de acordo com a invenção, sequências de nucleotídeos, cuja expressão resulta em uma sequência de RNA que é substancialmente homóloga a uma molécula de RNA de um gene-alvo em um inseto que contém uma sequência de RNA, codificada por uma sequência de nucleotídeos contida no genoma do inseto. Dessa forma, após ingestão da sequência estabilizada do RNA, pode ser obtida regulação negativa da sequência de nucleotídeos do gene-alvo nas células do inseto, resultando em efeito deletério sobre a manutenção, viabilidade, proliferação e infestação do inseto.

[0054] Conforme utilizado no presente, o termo "substancialmente homólogo" ou "homologia substancial", em referência a uma sequência de ácido nucléico, inclui uma sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições rigorosas para a sequência codificadora, conforme indicada em qualquer uma entre as SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, conforme indicadas na listagem de sequências ou os complementos destas. Sequências que hibridizam sob condições de rigor para qualquer uma entre as SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, conforme indicadas na listagem de sequências, ou os complementos

destas, são aquelas que permitem que um alinhamento em sentido contrário ao paralelo ocorra entre duas sequências, e as duas sequências são então capazes, sob condições de rigor, de formar pontes de hidrogênio com as bases correspondentes na fita oposta, formando uma molécula dúplice suficientemente estável, sob as condições de rigor, para ser detectável com métodos bem-conhecidos na técnica. Sequências substancialmente homólogas possuem, de preferência, de aproximadamente 70% a aproximadamente 80% de identidade de sequência, ou mais preferencialmente, de aproximadamente 80% a aproximadamente 85% de identidade de sequência, ou, o mais preferível, de aproximadamente 90% a aproximadamente 95% a aproximadamente 99% de identidade de sequência, em relação a sequências de nucleotídeos de referência, conforme indicadas por qualquer uma entre as SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, conforme indicado nas listagens de sequências, ou os complementos destas.

[0055] Conforme utilizado no presente, o termo "identidade de seqüência", "semelhança de sequência" ou "homologia" é utilizado para descrever relações de sequência entre uma ou mais sequências de nucleotídeos. O percentual de "identidade de sequência", entre duas sequências, é determinado pela comparação de duas sequências alinhadas da melhor forma sobre um intervalo de comparação, em que a parte da sequência, no intervalo da comparação, pode compreender acréscimos ou exclusões (isto é, lacunas), quando comparada à sequência de referência (a qual não compreende acréscimos ou exclusões), quanto ao alinhamento mais adequado das duas sequências. O percentual é calculado pela determinação do número de posições no qual uma base de ácido nucléico ou resíduo de aminoácido ocorre em ambas sequências e que resulta no número de posições combinadas, dividindo o número

de posições combinadas pelo número total de posições no intervalo de comparação e multiplicando o resultado por 100 para dar origem ao percentual de identidade de sequência. Uma sequência idêntica em todas as posições, em comparação a uma sequência de referência, é considerada como idêntica à sequência de referência e vice e ver-sa. Uma primeira sequência de nucleotídeos, quando observada na direção de 5' para 3', é considerada como "complemento" ou complementar de uma segunda sequência de nucleotídeos ou uma de referência, observada na direção de 3' para 5', se a primeira sequência de nucleotídeos exibe complementaridade completa com a segunda sequência ou a de referência. Conforme utilizadas no presente, moléculas de sequência de ácido nucléico são consideradas como exibindo "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma das sequências, lida de 5' para 3', é complementar de cada nucleotídeo da outra sequência, quando lida de 3' para 5'. Uma sequência de nucleotídeos, complementar de uma sequência de nucleotídeos de referência exibirá uma sequência idêntica à sequência invertida de complementos da sequência de nucleotídeos de referência. Estes termos e descrições são bem-definidos na técnica e podem ser entendidos com facilidade por qualquer versado na técnica.

[0056] Conforme utilizado no presente, um "intervalo de comparação" se refere a um conceito de segmento contendo, pelo menos, seis posições contíguas, geralmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, mais geralmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, em que uma sequência é comparada a uma sequência de referência com o mesmo número de posições contíguas, depois que duas sequências são alinhadas da melhor forma. O intervalo de comparação pode compreender acréscimos ou exclusões (isto é, lacunas) de aproximadamente 20% ou menos, em comparação

com a sequência de referência (a qual não compreende acréscimos ou exclusões), para a melhor forma de alinhamento das duas sequências. Versados na técnica devem vide os métodos detalhados, utiliza-dos para alinhamento de sequências no pacote de programas Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wis., USA ou consultarem Ausubel et al. (1998), para uma discussão detalhada de análise de sequências.

[0057] A presente invenção provê sequências de DNA que podem ser expressas sob a forma de RNA em uma célula ou microorganismo para ini-bição da expressão de um gene-alvo em uma célula, tecido ou órgão de um inseto. As sequências compreendem uma molécula de DNA que codifica uma ou mais sequências diferentes de nucleotídeos, em que cada uma das sequências diferentes de nucleotídeos compreende uma sequência de sentido de nucleotídeos e uma sequência antissenso de nucleotídeos, ligadas por uma sequência espaçadora que codifica uma molécula de dsRNA da presente invenção. A sequência espaçadora constitui parte da seqüên-cia de sentido de nucleotídeos ou da sequência antissenso de nucleotí-deos e forma-se, dentro da molécula de RNA, entre a sequência senso e a sequência antissenso. A sequência senso de nucleotídeos e a sequência antissenso de nucleotídeos são substancialmente idênticas à sequência de nucleotídeos do gene-alvo, ou de um derivado do mesmo ou de uma sequência complementar do mesmo. A molécula de dsDNA pode ser operacionalmente colocada sob o controle de uma sequência de promo-tor que funcione na célula, tecido ou órgão do hospedeiro que expressa o dsDNA para produzir moléculas de dsRNA . Em uma concretização, a se-qüência de DNA pode ser derivada de uma sequência de nucleotídeos con-forme indicada na SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906 na listagem de se-qüências.

[0058] A invenção provê também uma sequência de DNA para expressão em uma célula de uma planta que, na expressão do DNA para RNA e ingestão por uma praga visada, leva à supressão de um gene-alvo em uma célula, tecido ou órgão de um inseto-praga. O dsRNA compreende, pelo menos, uma ou múltiplas sequências estruturais do gene, em que a estrutura de cada sequência do gene compreende uma sequência senso de nucleotídeos e uma sequência antissenso de nucleotídeos, ligados por uma sequência espaçadora que forma uma alça dentro das sequências complementar e antissenso. A sequência senso de nucleotídeos ou a sequência antissenso de nucleotídeos são substancialmente idênticas à sequência de nucleotídeos do gene-alvo, um derivado do mesmo ou sequência complementar do mesmo. A sequência ou mais sequências estruturais do gene são colocadas operacionalmente sob o controle de uma ou mais sequências de promotor, sendo operável, pelo menos, uma destas na célula, tecido ou órgão de um organismo procariótico ou eucariótico, especialmente de uma planta.

[0059] Uma sequência ou fragmento de gene para controle de praga, de acordo com invenção, pode ser clonado entre dois promotores específicos do tecido, como dois promotores específicos de raiz, que podem ser operados em uma célula de planta transgênica e expressados na mesma para produzir mRNA, na célula da planta transgênica, que forma moléculas de dsRNA para o mesmo. As moléculas de dsRNA, contidas em tecidos da planta, são ingeridas por um inseto de forma que a supressão pretendida da expressão do gene-alvo é atingida.

[0060] Uma sequência de nucleotídeos, provida pela presente invenção, pode compreender uma repetição invertida, separada por uma "sequência espaçadora". A sequência espaçadora pode ser uma região compreendendo qualquer sequência de nucleotídeos que

facilite a formação de estrutura secundária entre cada repetição, quando esta for necessária. Em uma concretização da presente invenção, a sequência espaçadora é parte da sequência codificadora sentido ou antissenso do mRNA. A sequência espaçadora pode compreender, alternativamente, qualquer combinação de nucleotídeos ou homólogos dos mesmos, capazes de se ligarem covalentemente a uma molécula de ácido nucléico. A sequência espaçadora pode compreender uma sequência de nucleotídeos de, pelo menos, aproximadamente 10-100 nucleotídeos em extensão ou, alternativamente, de pelo menos aproximadamente 100-200 nucleotídeos em extensão, pelo menos aproximadamente 200-400 em extensão ou de, pelo menos, aproximadamente 400-500 nucleotídeos em extensão.

[0061] As moléculas de ácido nucléico ou fragmentos das moléculas de ácido nucléico ou outras moléculas de ácido nucléico, na listagem de sequências, são capazes de se hibridizarem especificamente para outras moléculas de ácido nucléico, sob certas circunstâncias. Conforme utilizadas no presente, duas moléculas de ácido nucléico são consideradas como capazes de se hibridizarem especificamente para uma outra, se as duas moléculas forem capazes de formar uma estrutura antiparalela de duplo filamento de ácido nucléico. Uma molécula de ácido nucléico é considerada como sendo o complemento de outra molécula de ácido nucléico se exibirem complementaridade completa. Duas moléculas são consideradas como sendo "minimamente complementar" se puderem hibridizar para uma outra com estabilidade suficiente que permita que se mantenham aneladas a uma outra, sob condições convencionais de, pelo menos, "baixo rigor". Semelhantemente, as moléculas são consideradas como sendo complementares se puderem hibridizar para uma outra com estabilidade suficiente que permita que se mantenham aneladas a

uma outra sob condições convencionais de "alto rigor". Condições convencionais de rigor são descritas por Sambrook et al. (1989) e por Haymes et al. (1985).

[0062] Distanciamentos de complementaridade completa são, por conseguinte, permitidos, desde que estes não impeçam completamente a capacidade das moléculas de formarem estrutura de dupla fita. Dessa forma, para que uma molécula de ácido nucléico ou fragmento da molécula de ácido nucléico sirva como iniciador ou sonda, ele precisa somente ser suficientemente complementar, em sequência, para ser capaz de formar uma estrutura estável de dupla fita, sob o aglutinante e concentrações de sal, especificamente empregados.

[0063] Condições apropriadas de rigor que promovam hibridização de DNA são, por exemplo, 6,0 x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC), em aproximadamente 45°C, seguido por lavagem com 2,0 x SSC a 50°C, e conhecidas de versados na técnica ou podem ser encontradas em Current Protocols in Molecular Biology (1989). Por exemplo, a concentração do sal, na etapa de lavagem, pode ser selecionada entre baixo rigor de aproximadamente 2,0 x SSC a 50°C a alto rigor de aproximadamente 0,2 x SSC a 50°C. Ademais, a temperatura na etapa de lavagem pode ser aumentada, de condições de baixo rigor em temperatura ambiente, aproximadamente 22°C, para condições de alto rigor de aproximadamente 65°C. Tanto a temperatura como o sal pode variar ou a temperatura ou a concentração do sal pode ser mantida constante enquanto que a outra variável é modificada. Um ácido nucléico utilizado na presente invenção pode hibridizar especificadamente para uma ou mais moléculas de ácido nucléico de WCR, ou complementos deste, sob estas condições. De preferência, um ácido nucléico utilizado na presente invenção exibirá, pelo menos, aproximadamente 80%, pelo

menos, aproximadamente 90%, pelo menos, aproximadamente 95%, pelo menos, aproximadamente 98% ou até mesmo aproximadamente 100% de identidade de sequência com uma ou mais moléculas de ácido nucléico, conforme indicadas na SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, conforme indicadas na listagem de sequências.

[0064] Ácidos nucléicos da presente invenção podem ser sintetizados também, completamente ou em parte, especialmente quando se desejar prover sequências preferidas de plantas, por métodos versados na técnica. Dessa forma, todos ou parte dos ácidos nucléicos da presente invenção podem ser sintetizados empregando códons preferidos por um hospedeiro selecionado. Códons preferidos de espécies podem ser determinados, por exemplo, dos códons mais frequentemente utilizados nas proteínas expressas em uma espécie particular de hospedeiros. Outras modificações das sequências de nucleotídeos podem resultar em mutantes com atividade ligeiramente alterada.

[0065] Sequências de nucleotídeos de dsRNA ou de siRNA compreendem fitas duplas de ribonucleotídeos polimerizados e podem incluir modificações à cadeia principal de fosfato-açúcar ou aos nucleosídeos. Modificações em estrutura de RNA podem ser adaptadas para permitir inibição genética específica. Em uma concretização, as moléculas de dsRNA podem ser modificadas por processo enzimático de forma que moléculas de siRNA possam ser geradas. O siRNA pode mediar eficientemente o efeito de regulação negativa de alguns genes-alvo em alguns insetos. Este processo enzimático pode ser obtido, utilizando uma enzima RNase III ou enzima DICER, presentes nas células de inseto, animal vertebrado, fungo ou planta na via eucariótica de RNAi (Elbashir et al., 2002; Hamilton e Baulcombe, 1999). Este processo pode utilizar também DICER ou RNase III recombinante, introduzidas nas células de um inseto-alvo

por meio de técnicas de DNA recombinante que são prontamente reconhecidas para os versados na técnica. As duas enzimas, DICER e RNase III, naturalmente existentes em um inseto ou sintetizadas por técnicas de DNA recombinante, efetuam a clivagem de fitas maiores do dsRNA em oligonucleotídeos menores. As enzimas DICER cortam especificamente as moléculas do dsRNA em pedaços de siRNA, cada uma das quais contando com aproximadamente 19-25 nucleotídeos, em extensão, enquanto que as enzimas RNase III efetuam normalmente a clivagem das moléculas de dsRNA em siRNA contanto com 12-15 pares de base. As moléculas de siRNA, produzidas por qualquer uma destas enzimas, possuem 2 a 3 nucleotídeos em ressalto em 3' e fosfato em 5' e terminal hidroxila em 3'. As moléculas de siRNA, geradas pela enzima RNase III, são iguais às produzidas pelas enzimas Dicer na via eucariótica do RNAi e são, por conseguinte, visadas e degradadas por um mecanismo celular inerente de degradação de RNA, depois que abertas e separadas em RNA de fita simples, e hibridizam com as sequências de RNA, transcritas pelo gene-alvo. Esse processo resulta na degradação ou remoção efetiva da sequência de RNA, codificada pela sequência de nucleotídeos do gene-alvo no inseto. O desfecho é o silenciamento de uma sequência especialmente visada de nucleotídeos, dentro do inseto. Descrições detalhadas de processos enzimáticos podem ser encontradas em Hannon (2002).

[0066] Uma sequência de nucleotídeos da presente invenção pode ser registrada em um meio de leitura por computador. Conforme utilizado no presente, "meio de leitura por computador" se refere a qualquer meio de expressão tangível que possa ser lido ou acessado diretamente por computador. Estes meios incluem, entre outros: meio de armazenamento magnético, como disquetes, disco rígido, meio de armazenamento e filamento magnética; meio de armazenamento

óptico, como CD-ROM; meio de armazenamen-to elétrico, como RAM e ROM; arquivos de computador, formatados para re-conhecimento de caracteres ópticos e híbridos dessas categorias, como meio de armazenamento magnético/óptico. Um versado pode apreciar de imediato que qualquer um dos meios de leitura por computador, conhecidos atualmente, pode utilizado para criar um produto compreendendo meio de leitura por computador contendo registros de sequência de nucleotídeos da presente invenção.

[0067] Conforme utilizado no presente, "registrado" se refere a um pro-cesso de armazenamento de informação em meio de leitura por computador. Um versado pode adotar imediatamente qualquer um dos métodos conheci-dos atualmente para registro de informação em meio de leitura por compu-tador para gerar meios que contenham informação sobre sequências de nucleotídeos da presente invenção. Há disponível uma variedade de estru-turas de armazenamento de dados, possibilitando que um versado crie um meio de leitura por computador contendo registros de sequências de nucle-otídeos da presente invenção. A escolha da estrutura de armazenamento de dados será, geralmente, baseada nos meios escolhidos para acesso à in-formação armazenada. Ademais, pode ser utilizada uma variedade de pro-gramas de processamento de dados e formatos para armazenar a informa-ção sobre sequências de nucleotídeos da presente invenção em meio de leitura por computador. A informação de sequências pode ser representada sob a forma de arquivo de processamento de texto, em programas formata-dos à disposição no mercado, como WordPerfect e Word da Microsoft, ou representados sob a forma de arquivo de texto ASCII, armazenado em apli-cativo de banco de dados, como DB2, Sybase, Oracle ou similar. O versado pode adaptar imediatamente qualquer número de formatos de estruturação de processamento de dados (por exemplo, arquivo de

texto ou banco de dados) para obter um meio de leitura por computador contendo registros da informação de sequências de nucleotídeos da presente invenção.

[0068] Há programas de computador disponíveis publicamente que permitem um versado acessar informação de sequências, providas em um meio de leitura por computador. O programa que implanta o BLAST (Altschul et al., 1990) e BLAZE (Brutlag et al., 1993) e pesquisa algoritmos em um sistema Sybase pode ser utilizado para identificar estruturas de leitura aberta (ORFs), dentro de sequências, como os Unigenes e EST que são aqui providos e que contenham homologia em relação a ORFs ou proteínas de outros organismos. Estas ORFs são fragmentos codificadores de proteínas, dentro das sequências da presente invenção, e são úteis para produção de proteínas de valor comercial, como enzimas utilizadas em biossíntese de aminoácidos, metabolismo, transcrição, tradução, processamento de RNA, degradação de ácido nucléico e de proteína, modificação de proteína e re-licação, restrição, modificação, recombinação e reparo de DNA.

[0069] A presente invenção provê ainda sistemas, principalmente sistemas baseados em computador, que contêm a informação de sequências, descritas neste pedido. Estes sistemas são criados para identificar fragmentos de valor comercial da molécula de ácido nucléico. Conforme utilizado no presente, "um sistema baseado em computador" se refere aos recursos referentes a componentes rígidos, programas e de armazenamento de dados, utilizados para analisar a informação sobre sequências de nucleotídeos da presente invenção. Os recursos mínimos referentes a componentes rígidos dos sistemas baseados em computador da presente invenção compreendem unidade central de processamento (CPU), recursos de entrada de informação, recursos de saída de informação e recursos de

armazenamento de dados. Um versado pode apreciar de imediato que qualquer um dos sistemas baseados em computador, atualmente disponíveis, são adequados para uso na presente invenção.

[0070] Conforme utilizado no presente, "motivo visado em estrutura" ou "motivo visado," se refere a qualquer sequência ou combinação de seqüências, racionalmente selecionadas, em que a sequência ou seqüências é escolhida com base em configuração tridimensional, formada ao ser efetuada a dobragem do motivo visado. Há uma variedade de motivos visados, conhecidos na técnica. Motivos que visam proteínas incluem, entre outros, sítios enzimáticos ativos e seqüências de sinalização. Motivos que visam ácido nucléico incluem, entre outros, seqüências de promotores, elementos cis, estruturas em grampo e elementos de indução de expressão (seqüências de ligação protéica).

B. Vetores recombinantes e transformação de célula hospedeira

[0071] Um vetor de DNA recombinante pode ser, por exemplo, um plasmídeo linear ou circular fechado. O sistema do vetor pode ser um único vetor ou plasmídeo ou dois ou mais vetores ou plasmídeos que contenham, em conjunto, todo o DNA a ser introduzido no genoma do hospedeiro bacteriano. Ademais, um vetor bacteriano pode ser um vetor de expressão. Moléculas de ácido nucléico, conforme indicadas na SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou fragmentos ou complementos destas, podem ser, por exemplo, adequadamente inseridas em um vetor, sob controle de um promotor adequado que funcione em um ou mais hospedeiros microbianos a forma direcionar a expressão de uma sequência codificadora de ligação ou outra sequência de DNA. Há muitos vetores disponíveis para essa finalidade, e a seleção do vetor apropriado dependerá, principalmente, do tamanho do ácido nucléico a ser inserido no vetor e da célula hospedeira em particular a ser transformada com o vetor. Cada vetor contém vários

componentes, de-pendendo de sua função (amplificação de DNA ou expressão de DNA) e da célula hospedeira em particular com a qual é compatível. Os componentes do vetor, para transformação bacteriana, incluem geralmente, entre outros, um ou mais dos seguintes: uma sequência de sinalização, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores de seleção e um promotor de in-dução que permita a expressão do DNA exógeno.

[0072] Vetores de expressão e de clonagem contêm geralmente um gene de seleção, referido também como marcador seletivo. Este gene codifi-ca uma proteína necessária para a sobrevivência ou crescimento das células hospedeiras transformadas em um meio de cultura seletivo. Genes de sele-ção típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato ou tetra-ciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, ou (c) suprem nutrien-tes fundamentais que não estão disponíveis no meio do complexo, por exemplo, o gene que codifica a D-alanina racemase do *Bacilli*. As células, transformadas com êxito com uma proteína heteróloga, ou fragmento desta, produzem uma proteína que confere resistência ao fármaco e, dessa forma, sobrevivem ao regime de seleção.

[0073] Um vetor de expressão, produtor de mRNA, pode conter também um promotor de indução que é reconhecido pelo organismo bacteriano hospedeiro e está operacionalmente ligado ao ácido nucléico que codifica, por exemplo, a molécula do ácido nucléico, codificadora do mRNA do *D. v. virgifera* ou fragmento deste de interesse. Promotores de indução, cujo uso é adequado com hospedeiros bacterianos incluem o promotor da β -lactamase, fago * de promotores PL e PR do *E. coli* e promotor da galactose do *E. coli*, promotor da arabinose, promotor da fosfatase alcalina, promotor do triptofano (*trp*) e o promotor operon da lactose e variações deste e

promo-tores híbridos, como o promotor tac promoter. No entanto, outros promotores conhecidos de indução bacteriana são adequados.

[0074] O termo "ligado operacionalmente", conforme é utilizado em referência a sequência reguladora e estrutura de sequência de nucleotídeos, significa que a sequência reguladora regula a expressão da sequência de nucleotídeos ligada à estrutura. "Sequências reguladoras" ou "elementos de controle" referem—se a sequências de nucleotídeos localizadas em sentido ascendente (sequências não codificadoras 5'), no interior, ou no sentido descendente (sequências não traduzidas 3') da estrutura de uma sequência de nucleotídeos, e que influenciam o momento e nível ou quantidade de transcrição, processamento ou estabilidade do RNA ou a tradução da estrutura associada à sequência de nucleotídeos. Sequências reguladoras podem incluir promotores, sequências líderes de tradução, introns, intensificadores estruturas em laço, sequências repressoras de ligação, sequências de reconhecimento de poliadenilação e similar.

[0075] Alternativamente, os constructos de expressão podem ser integradas no genoma bacteriano com um vetor de integração. Vetores de integração contêm tipicamente, pelo menos, uma sequência homóloga ao cromossomo da bactéria que permita a integração do vetor. As integrações parecem resultar de recombinações entre DNA homólogo no vetor e o cromossomo bacteriano. Por exemplo, vetores de integração construídos com DNA de várias cepas de Bacillus, integram-se em seu cromossomo (EP 0 127 328). Vetores de integração podem compreender também bacteriófagos ou sequências transposon. Vetores suicidas são conhecidos também na técnica.

[0076] O constructo de vetores adequados, contendo um ou mais dos componentes listados acima, emprega técnicas convencionais de DNA recombinante. Plasmídeos isolados ou fragmentos de DNA são

clivados, ajustados e ligados mais uma vez na forma desejada para gerar os plasmídeos requeridos. Exemplos de vetores bacterianos disponíveis de expressão incluem, entre outros, os vetores de clonagem e expressão multifuncionais do *E. coli*, como o Bluescript® (Stratagene, La Jolla, CA), no qual, por exemplo, uma proteína do *D. v. virgífera*, ou fragmento desta, pode ser ligado ao vetor, na estrutura com sequências para o Met amino-terminal e os 7 resíduos subsequentes da α -galactosidase de forma que uma proteína híbrida é produzida; vetores pIN (Van Heeke e Schuster, 1989); e similar.

[0077] Um constructo recombinante de levedura pode incluir tipicamente um ou mais dos seguintes: sequência de promotor, sequência associada de fusão, sequência líder, sequência de término de transcrição e marcador de seleção. Esses elementos podem ser combinados em cartucho de expressão, o qual pode ser mantido em replicon, como um elemento extra-cromossômico (por exemplo, plasmídeos), capazes de manutenção estável em um hospedeiro, como levedura ou bactéria. O replicon pode conter dois sistemas de replicação, permitindo, dessa forma, a sua manutenção, por exemplo, em levedura para expressão, e em hospedeiro procariótico para clonagem e amplificação. Exemplos destes vetores tipo ponte (shuttle) de levedura e bactéria incluem YEp24 (Botstein et al., 1979), pCI/1 (Brake et al., 1984) e YRp17 (Stinchcomb et al., 1982). Além disso, um replicon pode ser um plasmídeo com número alto ou baixo de cópias. Um plasmídeo de número alto de cópias pode conter um número de cópias que varia de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 e, tipicamente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Um hospedeiro contendo um plasmídeo com número alto de cópias terá, pelo menos, aproximadamente 10 e, mais preferencialmente, pelo menos, aproximadamente 20.

[0078] Sequências úteis de promotor de levedura podem ser

derivadas de genes que codificam enzimas presentes na via metabólica. Exemplos destes genes incluem álcool desidrogenase (ADH) (EP 0 284044), enolase, glicoquinase, glicose-6-fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAP ou GAPDH), hexoquinase, fosfofrutoquinase, 3-fosfoglicerato mutase e piruvato quinase (PyK) (EP 0 3215447). O gene PHO5 de levedura, codificador da fosfatase ácida, fornece também sequências úteis de promotores (Myanohara et al., 1983). Ademais, promotores sintéticos que não ocorrem em natureza funcionam também como promotores de levedura. Exemplos destes promotores híbridos incluem a sequência reguladora da ADH, ligada à região de ativação da transcrição da GAP (Patentes U.S. Nº 4 876 197 e 4 880 734). Exemplos de sequências terminadoras de transcrição e outras sequências de terminação, reconhecidas de leveduras, como aquelas que codificam enzimas glicolíticas, são conhecidas de versados na técnica.

[0079] Alternativamente, os constructos de expressão podem ser integrados no genoma da levedura com um vetor de integração. Vetores de integração contêm tipicamente, pelo menos, uma sequência homóloga ao cromossomo de uma levedura que permita que o vetor seja integrado e, de preferência, contêm duas sequências homólogas, ladeando o constructo de expressão. Integrações parecem resultar de recombinações entre DNA homólogo no vetor e no cromossomo da levedura (Orr-Weaver et al., 1983). Um vetor de integração pode ser direcionado a um loco específico, na levedura, pela seleção da sequência homóloga apropriada para inclusão no vetor. Vide Orr-Weaver et al., supra. Um ou mais constructos de expressão podem ser integrados, possivelmente afetando níveis da proteína recombinante produzida (Rine et al., 1983).

[0080] A presente invenção contempla também a transformação

de uma sequência de nucleotídeos da presente invenção em uma planta de forma a serem atingidos níveis de uma ou mais moléculas de dsRNA que inibam a expressão da praga. Um vetor de transformação pode ser preparado de imediato empregando métodos disponíveis na técnica. O vetor de transformação compreende uma ou mais sequências de nucleotídeos que é/são capazes de serem transcritas em uma molécula de RNA e que é/são substancialmente homólogas e/ou complementares de uma ou mais sequências de nucleotídeos, codificadas pelo genoma do inseto, de forma que na absorção do RNA, há regulação negativa de, pelo menos, uma das respectivas sequências de nucleotídeos do genoma do inseto.

[0081] O vetor de transformação pode ser denominado um constructo de dsDNA e pode ser definido também como uma molécula recombinante, um agente de controle de inseto, uma molécula genética ou um constructo genético quimérico. Um constructo genético quimérico da presente invenção pode compreender, por exemplo, sequências de nucleotídeos que codificam um ou mais transcritos antissenso, um ou mais transcritos sentido, um ou mais de cada um dos supramencionados, em que todos ou parte de um transcrito, resultante do mesmo, são homólogos a toda ou parte de uma molécula de RNA, compreendendo uma sequência de RNA codificada por uma sequência de nucleotídeos, incluída no genoma do inseto.

[0082] Em uma concretização, o vetor de transformação da planta compreende uma molécula de DNA, isolada e purificada, incluindo um promotor, ligado operacionalmente a uma ou mais sequências de nucleotídeos da presente invenção. A sequência de nucleotídeos é selecionada do grupo constituído pela SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, conforme indicadas na listagem de sequências. A sequência de nucleotídeos inclui um segmento que codifica todo ou parte de um RNA, presente no transcrito do RNA de uma praga visada, e pode

compreender repetições invertidas de todo ou parte do RNA de uma praga visada. A molécula de DNA, compreendendo o vetor de expressão, pode conter ainda uma sequência de intron, posicionada no sentido ascendente da sequência codificadora, ou mesmo incluída na sequência codificadora, e pode conter também uma sequência líder não traduzida da extremidade cinco (5') (isto é, UTR ou 5'-UTR), posicionada entre o promotor e o ponto de início de tradução.

[0083] Um vetor de transformação de planta pode conter sequências de mais de um gene, permitindo, dessa forma, a produção de mais de um dsR-NA para inibição de dois ou mais genes em células de uma praga-alvo. Um versado na técnica apreciará prontamente que segmentos de DNA, cuja sequência corresponda àquela presente em genes diferentes, podem ser combinados em um único segmento composto de DNA para expressão em uma planta transgênica. Alternativamente, um plasmídeo da presente invenção já contendo, pelo menos, um segmento de DNA, pode ser modificado pela inserção seriada de segmentos adicionais de DNA entre as sequências do realçada e promotor e do terminador. No antes de controle do inseto da presente invenção, criado para a inibição de múltiplos genes, os genes a serem inibidos podem ser obtidos da mesma espécie de inseto, de forma a intensificar a efetividade do agente de controle do inseto. Em certas concretizações, os genes podem derivar de insetos diferentes para ampliar a faixa de insetos contra os quais o agente é efetivo. Quando múltiplos genes são direcionados para supressão ou combinação de expressão e supressão, um elemento policistrônico de DNA pode ser fabricado conforme ilustrado e descrito em Fillati, Publicação do Pedido de Patente Nº US 2004-0029283.

[0084] Promotores que funcionam em plantas de espécies diferentes são também bem-conhecidos na técnica. Promotores úteis

para expressão de polipeptídeos em plantas incluem aqueles de indução, virais, sintéticos ou constitutivos, conforme descritos em Odell et al. (1985), e/ou promotores que são temporariamente regulados e espaço-temporariamente regulados. Promotores preferidos incluem os promotores aperfeiçoados CaMV35S e o promotor FMV35S. Para a finalidade da presente invenção, por exemplo, para melhor forma de controle de espécies que se alimentam de raízes, pode-se preferível atingir os níveis mais altos de expressão daqueles genes no interior das raízes de plantas. Alguns promotores aperfeiçoados para raízes foram identificados e são conhecidos na técnica (Lu et al., 2000; Patentes U.S. Nº 5 837 848 e 6 489 542).

[0085] Um vetor ou constructo de DNA recombinante da presente invenção compreenderá, tipicamente, um marcador seletivo que confere um fenótipo seletivo a células de plantas. Marcadores seletivos podem ser utilizados também para selecionar plantas ou células de plantas que contêm os ácidos nucleicos exógenos que codificam polipeptídeos ou proteínas da presente invenção. O marcador pode codificar resistência biocida, resistência a antibiótico (por exemplo, canamicina, bleomicina G418, higromicina, etc.) ou resistência a herbicida (por exemplo, glifosato, etc.). Exemplos de marcadores seletivos incluem, entre outros, neogene que codifica resistência à canamicina e que pode ser selecionado, empregando canamicina, G418, etc., gene bar que codifica resistência a bialafos; gene mutante de EPSP sintase que codifica resistência a glifosato; gene de nitrilase que confere resistência bromoxinil; gene mutante de acetolactato sintase (ALS) que confere resistência a imidazolinona ou sulfoniluréia e gene DHFR resistente a metotrexato. Exemplos destes marcadores seletivos são ilustrados nas Patentes U.S. 5 550 318; 5 633 435; 5 780 708 e 6 118 047.

[0086] Um vetor ou constructo recombinante da presente invenção

po-de incluir também um marcador capaz de ser examinado. Marcadores capaz de ser examinado podem ser utilizados para monitorar expressão. Exemplos de marcadores capaz de ser examinado incluem gene de β -glicuronidase ou uidA (GUS) que codifica uma enzima para a qual vários substratos cromo-gênicos são conhecidos (Jefferson, 1987; Jefferson et al., 1987); genes de locus R que codifica um produto que regula a produção de pigmentos da antocianina (cor vermelha), em tecidos vegetais (Dellaporta et al., 1988); gene de β -lactamase (Sutcliffe et al., 1978), gene que codifica uma enzima para a qual vários substratos cromogênicos são conhecidos (por exemplo, PADAC, cefalosporina cromogênica); gene de luciferase (Ow et al., 1986), gene xyle (Zukowsky et al., 1983) que codifica catecol desoxigenase que converte catecóis cromogênicos; gene de α -amilase (Ikata et al., 1990); gene de tirosinase (Katz et al., 1983) que codifica uma enzima capaz de oxidar a tirosina para DOPA e dopaquinona, a qual por seu turno condensa e se transforma em melanina; α -galactosidase que cataliza um substrato cromogênico da α -galactose.

[0087] Vetores preferidos de transformação de plantas incluem aqueles derivados de plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (por exemplo, Patentes U.S. N^{os} 4 536 475, 4 693 977, 4 886 937, 5 501 967 e EP 0 122 791). Plasmídeos de *Agrobacterium rhizogenes* (ou "Ri") são úteis também e conhecidos na técnica. Outros vetores preferidos de transformação de plantas incluem aqueles expostos, por exemplo, por Herrera-Estrella (1983), Bevan (1983), Klee (1985) e EP 0 120 516.

[0088] Geralmente, é preferível introduzir um DNA recombinante funcional em um local não-específico no genoma de uma planta. Em casos especiais, pode ser útil inserir um constructo de DNA recombinante por integração sítio-específico. Diversos sistemas de

recombinação sítio-específico são conhecidos por operarem em implantes, incluindo cre-lox, conforme descrito na Patente U.S. 4 959 317, e FLP-FRT conforme descrito na Patente U.S. 5 527 695.

[0089] Métodos adequados de transformação de células hospedeiras que podem ser utilizados com a presente invenção, supostamente, incluem virtualmente qualquer método pelo qual DNA pode ser introduzido em uma célula como, por liberação direta de DNA como transformação de protoplastos, mediada por PEG (Omirulleh et al., 1993), absorção de DNA mediada por dissecação/inibição (Potrykus et al., 1985), eletroporação (Patente U.S. Nº 5 384 253), agitação com fibras de carboneto de silicone (Kaepler et al., 1990; Patente U.S. Nº 5 302 523 e Patente U.S. Nº 5 464 765), transformação mediada por *Agrobacterium* (Patente U.S. Nº 5 591 616 e Patente U.S. Nº 5 563 055) e por aceleração de partículas revestidas com DNA (Patente U.S. Nº 5 550 318; Patente U.S. Nº 5 538 877 e Patente U.S. Nº 5 538 880), etc. Por meio de aplicação de técnicas como estas, as células de virtualmente qualquer espécie podem ser estavelmente transformadas. No caso de espécies multicelulares, as células transgênicas podem ser regeneradas em organismos transgênicos.

[0090] Métodos para a criação de plantas transgênicas e expressão de ácidos nucleicos heterólogos, especialmente em plantas, são conhecidos e podem ser utilizados com os ácidos nucleicos providos neste pedido, para preparar plantas transgênicas que exibam susceptibilidade reduzida à alimentação por organismos da praga-alvo, como larvas alfinete de milho. Vetores de transformação de plantas podem ser preparados, por exemplo, pela inserção de ácidos nucleicos produtores do dsRNA, descrito no presente, nos vetores de transformação de plantas, e introdução destes nas plantas. Um sistema conhecido de vetor foi derivado pela modificação do sistema natural de transferência de genes do *Agrobacterium tumefaciens*. O

sistema natural compreende plasmídeos grandes Ti (indutores de tumor), contendo um segmento grande conhecido como T-DNA, que é transferido para plantas transformadas. Outro segmento do plasmídeo Ti, a região vir, é responsável pela transferência do T-DNA. A região do T-DNA é limitada por terminais repetidos. Nos vetores binários modificados, os genes indutores de tumor foram deletados e as funções, da região vir, são utilizadas para transferir DNA estrangeiro, limitado por sequências que ladeiam o T-DNA. A região T pode conter também um marcador seletivo para recuperação eficiente de plantas e células transgênicas, e um sítio múltiplo de clonagem para inserção de sequências para transferência, como de um ácido nucléico codificador de dsRNA.

[0091] Uma planta transgênica, formada empregando métodos de transformação com *Agrobacterium*, contém tipicamente uma única sequência simples de DNA recombinante, inserida em um cromossomo, e esta é referida como evento transgênico. Estas plantas transgênicas pode ser referidas como sendo heterozigóticas em relação à sequência exógena inserida. Uma planta transgênica homozigótica, em relação a transgene, pode ser obtida separando uma planta transgênica segregada independente para produzir semente F1. Um quarto da semente F1 produzida será homozigótica, em relação ao transgene. A germinação de semente F1 resulta em plantas que podem ser testadas quanto à heterozigozidade ou homozigozidade, empregando tipicamente um ensaio de SNP ou ensaio de amplificação térmica que permita a distinção entre heterozigóticas e homozigóticas (isto é, um ensaio de zigozidade).

C. Expressão de ácido nucléico e supressão de gene-alvo

[0092] A presente invenção provê, como exemplo, um hospedeiro transformado ou organismo simbiótico da praga-alvo, células de plantas transformadas e plantas transformadas e suas progênes. As

células de plantas transformadas e plantas transformadas podem ser construídas para expressarem um ou mais das sequências de dsRNA ou de siRNA, descritas neste pedido, a fim de fornecer efeito protetor contra pragas. Estas seqüên-cias podem ser utilizadas para supressão gênica em um organismo de pra-ga e redução, pelo mesmo, do dano causado pela praga em um hospedeiro ou organismo simbiótico transformado protegido. Conforme utilizado no pre-sente, o termo "supressão de gene" pretende referir-se a qualquer um dos métodos bem-conhecidos de redução dos níveis de transcrição do gene pa-ra mRNA e/ou tradução subsequente do mRNA.

[0093] Supressão de gene pretende também significar a redução de expressão protéica de um gene ou de uma sequência codificadora, incluin-do supressão pós-transcricional do gene e supressão transcricional. A su-pressão transcricional do gene é mediada pela homologia entre todo ou par-te de um mRNA transcrito de um gene ou de uma sequência codificadora, direcionada para supressão, e o RNA de fita dupla correspondente, utilizado para supressão, referindo-se à redução substancial e mensurável da quantidade de mRNA disponível na célula para ligação pelos ribosso-mos. O RNA transcrito pode estar em orientação sentido em relação ao efei-to, o que é denominado co-supressão, e na orientação antissenso em rela-ção ao efeito, o que é denominado supressão antissenso, ou em ambas as orientações, produzindo um dsRNA, em relação ao efeito, denominado RNA de interferência (RNAi).

[0094] A supressão transcricional é mediada pela presença na célula de um agente de supressão de gene do dsRNA, exibindo identidade de se-qüência substancial a uma sequência de promotor de DNA, ou o comple-mento da mesma, em relação ao feito, o que é referido como supressão trans promotor. A supressão do gene pode ser efetiva contra um gene nativo de planta, associado com um traço,

por exemplo, fornecer plantas com ní-veis reduzidos de uma proteína, codificada pelo gene nativo, ou com níveis intensificados ou reduzidos de um metabólito afetado. A supressão de genes pode ser efetiva também contra genes-alvo em pragas de plantas, os quais podem ingerir ou entrar em contato com material da planta que contenha agentes de supressão do gene, especificamente criados para inibir ou suprimir a expressão de uma ou mais sequências homólogas ou complementares, nas células da praga. A supressão pós-transcricional de genes, por RNA em orientação sentido ou antissenso, para regular expressão genética em células de plantas, é exposta nas Patentes U.S. Nºs 5 107 065, 5 759 829, 5 283 184 e 5 231 020. O uso de dsRNA para suprimir genes em plantas é descrito em WO 99/53050, WO 99/49029, Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2003/0175965 e 2003/0061626, Pedido de Patente U.S. No.10/465 800 e Patentes U.S. Nºs 6 506 559 e 6 326 193.

[0095] Um método benéfico de supressão pós-transcricional de genes, em plantas, emprega RNA transcrito em orientação sentido e antissenso, estabilizado, por exemplo, sob a forma de grampo e estrutura em laço. Um constructo preferido de DNA que suprima o gene depois de transcrição é aquela em que o primeiro segmento codifica um RNA em orientação antissenso, exibindo identidade substancial a um segmento de um gene visado para supressão, o qual é ligado a um segundo segmento, em orientação sentido, que codifica um RNA exibindo complementaridade substancial em relação ao primeiro segmento. Este constructo forma uma estrutura em laço, a partir das sequências de nucleotídeos que ligam os dois segmentos (vide WO94/01550, WO98/05770, US 2002/0048814 e US 2003/0018993).

[0096] De acordo com uma concretização da presente invenção, é pro-vida uma sequência de nucleotídeos, cuja expressão in vitro

resulta em transcrição de uma sequência estabilizada de RNA, substancialmente ho-móloga a uma molécula de RNA de um gene visado em um inseto que compreende uma sequência de RNA, codificada por uma sequência de nu-cleotídeos incluída no genoma do inseto. Dessa forma, depois que o inseto ingerir a sequência estabilizada de RNA, incorporada a uma dieta ou pulve-rizada sobre a superfície de uma planta, a regulação negativa da sequência de nucleotídeos, correspondente ao gene-alvo nas células de um inseto visado, é afetada.

[0097] A inibição de um gene-alvo, empregando a tecnologia de dsR-NA estabilizado da presente invenção é específica de sequências, em que sequências de nucleotídeos, correspondentes à região dúplex do RNA, são visadas para inibição genética. RNA que contenha sequências de nucleotí-deos, idênticas a uma parte do gene-alvo, é preferido para inibição. Foi constatado também que sequências de RNA com inserções, exclusões e mutações de ponto único, em relação à sequência-alvo, são efetivas quanto à inibição. Quando a presente invenção for executada, é preferível que o dsRNA inibidor e a parte do gene-alvo compartilhem, pelo menos, aproxi-madamente 80% de identidade de sequência, aproximadamente 90% de identidade de sequência, aproximadamente 95% de identidade de seqüên-cia, aproximadamente 99% de identidade de sequência ou mesmo aproxi-madamente 100% de identidade de sequência. Alternativamente, a região dúplex do RNA pode ser definida funcionalmente como uma sequência de nucleotídeos capaz de se hibridizar com uma parte do transcrito do gene-alvo. Uma sequência de extensão menor do que a completa, exibindo ho-mologia maior compensa uma sequência mais longa porém menos homólo-ga. A extensão das sequências idênticas de nucleotídeos pode conter, pelo menos, aproximadamente 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ou, pelo menos, aproximadamente 1000

bases. Normalmente deve ser utilizada uma sequência contendo com mais de 20-100, embora uma sequência contendo com mais de aproximadamente 200-300 nucleotídeos seria preferível, e uma sequência contendo com mais de aproximadamente 500-1000 nucleotídeos seria, especialmente preferida, dependendo do tamanho do gene-alvo. A invenção possui a vantagem de poder tolerar variações de sequências que poderiam ocorrer em decorrência de mutação genética, polimorfismo de ce-pas ou divergência evolutiva. A molécula de ácido nucléico introduzida não precisa ser de homologia absoluta, não precisa ser da extensão completa, em relação ao produto primário da transcrição, ou mRNA inteiramente processado do gene-alvo. Por conseguinte, aqueles versados na técnica precisam perceber que, conforme descrita neste pedido, não é preciso 100% de identidade de sequência para a prática da presente invenção.

[0098] A inibição da expressão do gene-alvo pode ser quantificada pela medição do RNA endógeno visado ou a proteína produzida por tradução do RNA-alvo, e as consequências da inibição podem ser confirmadas por exame das propriedades visíveis da célula ou organismo. Técnicas para quantificação de RNA e de proteínas são bem-conhecidas de qualquer versado na técnica. Há marcadores seletivos múltiplos disponíveis que conferem resistência à ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, canamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina, espetinomicina, rifampicina, tetraciclina e similar.

[0099] Em certas concretizações, a expressão do gene é inibida em, pelo menos, 10%, preferencialmente em, pelo menos, 33%, mais preferencialmente em, pelo menos, 50% e ainda mais preferencialmente em, pelo menos, 80%. Em concretizações especialmente preferidas da invenção, a expressão do gene é inibida em, pelo menos, 80%, mais preferencialmente em, pelo menos, 90%,

mais preferencialmente em, pelo menos, 95% ou em, pelo menos, 99%, no interior de células do inseto, de forma que ocorra uma inibição significativa. Inibição significativa pretende referir-se à inibição que resulte em fenótipo detectável (por exemplo, interrupção do crescimento lar-val, paralisia ou mortalidade, etc.) ou diminuição detectável em RNA e/ou proteína, correspondente ao gene-alvo que está sendo inibido. Embora em certas concretizações da invenção, a inibição ocorra em substancialmente todas as células do inseto, em outras concretizações preferidas, a inibição ocorre somente em um subconjunto de células que expressam o gene. Por exemplo, se o gene a ser inibido desempenha papel fundamental em células no trato alimentar do inseto, a inibição do gene nestas células é suficiente para exercer um efeito deletério sobre o inseto.

[00100] As moléculas de dsRNA podem ser sintetizadas in vivo ou in vitro. O dsRNA pode ser formado por uma fita simples autocomplementar do RNA ou por duas fitas complementares do RNA. RNA polimerase endógena da célula pode mediar a transcrição in vivo, ou RNA polimerase clonada pode ser utilizada para transcrição in vivo ou in vitro. A inibição pode ser direcionada por transcrição específica em um órgão, tecido ou tipo de célula; estimulação de uma condição ambiental (por exemplo, infecção, estresse, temperatura, indutores químicos); e/ou transcrição construída em uma etapa de desenvolvimento ou idade. As fitas do RNA podem ser poliadeniladas ou não; as fitas do RNA podem ser capazes ou não de ser traduzidas em um polipeptídeo por sistema de tradução de uma célula.

[00101] RNA, dsRNA, siRNA, ou miRNA da presente invenção podem ser produzidos quimicamente ou enzimaticamente por métodos na técnica por reações manuais ou automáticas ou in vivo em outro organismo. O RNA pode ser produzido também por síntese orgânica parcial ou total; qualquer ribonucleotídeo modificado pode ser

introduzido por síntese enzimática in vitro ou orgânica. O RNA pode ser sintetizado por RNA polimerase celular ou RNA polimerase de bacteriófago (por exemplo, T3, T7, SP6). O uso e produção de um constructo de expressão são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, WO 97/32016; Patentes U.S. N^os 5 593 874, 5 698 425, 5 712 135, 5 789 214 e 5 804 693). Se sintetizado quimicamente ou por síntese enzimática in vitro, o RNA pode ser purificado antes de ser introduzido na célula. Por exemplo, o RNA pode ser purificado de uma mistura por extração com aglutinante ou reína, precipitação, eletroforese, cromatografia ou uma combinação destes. Alternativamente, o RNA pode ser utilizado sem ou purificação mínima para evitar perdas decorrentes de processamento de amostras. O RNA pode ser secado para armazenamento ou dissolvido em solução aquosa. A solução pode conter tampões ou sais para promover anelamento e/ou estabilização das fitas dúplices.

[00102] Para transcrição de um transgene in vivo ou construção de expressão, uma região reguladora (por exemplo, promotor, intensificador, silenciador e poliadenilação) pode ser utilizada para transcrever a fita (ou fitas) do RNA. Por conseguinte, em uma concretização, as sequências de nucleotídeos, utilizadas na produção de moléculas de RNA, podem estar operacionalmente ligadas a uma ou mais sequências funcionais do promotor em um microorganismo, fungo ou célula hospedeira de planta. Idealmente, as sequências de nucleotídeos são postas sob controle de um promotor endógeno que reside normalmente no genoma do hospedeiro. A sequência de nucleotídeos da presente invenção, sob controle da sequência operacionalmente ligada do promotor, pode ser ainda flanqueada por sequências adicionais que afetam favoravelmente a sua transcrição e/ou a estabilidade de um transcrito resultante. Estas sequências são geralmente localizadas em direção ascendente do promotor ligado

operacionalmente e/ou direção descendente da extremidade 3' do constructo de expressão, e podem ocorrer tanto em direção ascendente do promotor e descendente da extremidade 3' do constructo de expressão, embora somente esta sequência ascendente seja também complementada.

[00103] Conforme utilizado no presente, o termo "agente de controle de inseto" ou "agente de supressão de gene" se refere a uma molécula específica de RNA, compreendendo um primeiro segmento de RNA e um segundo segmento de RNA, em que a complementaridade entre o primeiro e segundo segmentos de RNA resulta na capacidade dos dois segmentos de se hibridizarem in vivo e in vitro para formar uma molécula de fita dupla. Pode ser preferível, de modo geral, incluir um terceiro segmento de RNA que se liga e estabiliza a primeira e a segunda sequência de forma que toda a estrutura se torne do tipo em laço, ou até estruturas que se hibridizam mais fortemente que podem formar estrutura do tipo semicircular fechada. Alternativamente, uma estrutura simétrica em grampo poderia ser formada sem um terceiro segmento, em que não é criada alça, porém por motivos estéricos, um grampo criaria a sua própria alça quando a haste fosse longa suficiente para estabilizar-se. O primeiro e segundo segmento do RNA terão geralmente o comprimento da molécula do RNA e conterão repetições substancialmente invertidas de cada um e serão reunidos pelo terceiro segmento de RNA. O primeiro e segundo segmento são invariavelmente correspondentes e não, respectivamente, a uma sequência senso e antissenso em relação ao RNA-alvo, transcrito do gene-alvo, no inseto-praga-alvo, que foi suprimido pela ingestão da molécula do dsRNA. O agente de controle do inseto pode ser também uma molécula purificada (ou isolada) de ácido nucléico e, mais especificamente, moléculas de ácido nucléico ou fragmento de ácido nucléico da mesma, proveniente

de DNA genômico (gDNA) ou bi-biblioteca de cDNA. Alternativamente, os fragmentos podem compreender oligonucleotídeos menores com aproximadamente 15 a aproximadamente 250 resíduos de nucleotídeos e, mais preferencialmente, com aproximadamente 15 a aproximadamente 30 resíduos de nucleotídeos.

[00104] Conforme utilizado no presente, o termo "genoma", conforme se aplica a células de inseto ou de hospedeiro, abrange não só DNA cromossômico, encontrado no interior do núcleo, mas também DNA de organelas, encontrados no interior de componentes subcelulares da célula. Os DNA da presente invenção, introduzidos em células de plantas, podem, por conseguinte, estar integrados em cromossomos ou localizados em organelas. O termo "genoma", conforme se aplica a bactérias, engloba o cromossomo e plasmídeos dentro de uma célula hospedeira bacteriana. Os DNA da presente invenção, introduzidos em células hospedeiras bacterianas podem, por conseguinte, estar integrados em cromossomo ou localizados em plasmídeos.

[00105] Conforme utilizado no presente, o termo "praga" se refere a insetos, aracnídeos, crustáceos, fungos, bactérias, vírus, nematódeos, platelmintos, asquelmintos, oxiúros, áscaris, tênias, tripanossomos, esquistossomos, moscas dermatobias, carrapatos, ácaros e piolhos e similares é disseminada no ambiente humano e que pode ingerir ou entrar em contato com uma ou mais células, tecidos ou líquidos produzidos por hospedeiro ou simbionte da praga, transformado para expressar ou ser revestido por agente de supressão de gene de fita dupla ou que pode ingerir material da planta, contendo o agente de supressão do gene. Conforme utilizado no presente, um traço de "resistência a praga" é uma característica de planta transgênica, animal transgênico, hospedeiro transgênico ou simbionte transgênico que faz com que a planta, animal, hospedeiro

ou simbiote seja resistente ao ataque de uma praga, que tipicamente é capaz de infligir dano ou perda à planta, animal, hospedeiro ou simbiote. Esta resistente a praga pode ser decorrente de mutação natural ou, mais tipicamente, de incorporação de DNA recombinante que confere resistência a praga. Para transmitir resistência a inseto para uma planta transgênica, um DNA recombinante pode, por exemplo, ser transcrito em uma molécula de RNA, dentro dos tecidos ou líquidos da planta recombinante. A molécula de dsRNA é incluída em parte de um segmento de RNA, idêntico a um segmento correspondente de RNA codificado a partir de uma sequência de DNA dentro de um inseto-praga que prefere se alimentar da planta recombinante. A expressão do gene no inseto-praga visado é suprimida pelo dsRNA, sendo que esta supressão de expressão do gene no inseto-praga visado, faz com que a planta torne-se resistente ao inseto. Fire et al. (Patente U.S. Nº 6 506 599) descreve geralmente inibição de infestação por praga, fornecendo informação específica somente sobre várias sequências de nucleotídeos que são efetivas para inibição de função genética na espécie de nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Igualmente, Plaetinck et al. (US 2003/0061626) descreve o uso de dsRNA para inibir função genética em uma variedade de pragas da espécie nematódeo. Mesa et al. (US 2003/0150017) descreve o uso de sequências de dsDNA para transformar células hospedeiras para que expressem sequências de dsRNA correspondentes, substancialmente idênticas a sequências-alvo em patógenos específicos, descrevendo especialmente o constructo de plantas recombinantes que expressam sequências de dsRNA para ingestão por várias pragas de plantas, facilitando a regulação negativa de um gene, no genoma da praga, e melhorando a resistência da planta contra infestação pela praga.

[00106] A presente invenção provê inibição de expressão gênica de

um ou mais genes múltiplos visados em uma praga-alvo, empregando métodos de dsRNA estabilizados. A invenção é especialmente útil na modulação de genes eucarióticos, em particular, a modulação de expressão de genes pre-sentes em pragas que exibem nível de pH em sistema digestivo que varia de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,5, mais preferencialmente, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0 e, ainda mais preferencialmente, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. Em relação a pragas de plantas com sistema digestivo que exhibe níveis de pH não incluídos em esses intervalos, pode ser desejável que o uso não requeira ingestão de moléculas de dsRNA.

[00107] O efeito modulador do dsRNA pode ser aplicado a uma variedade de genes expressos nas pragas, incluindo, por exemplo, genes endógenos, responsáveis por metabolismo ou transformação celular, incluindo genes de manutenção do metabolismo, fatores de transcrição e outros genes que codificam polipeptídeos envolvidos no metabolismo celular.

[00108] Conforme utilizada no presente, a frase "inibição de expressão gênica" ou "inibição de expressão de um gene-alvo na célula de um inseto" se refere à ausência (ou diminuição observável) no nível de proteína e/ou mRNA, cuja produção é resultante do gene-alvo. Especificidade se refere à capacidade de inibir o gene-alvo sem efeitos evidentes sobre outros genes da célula e sem quaisquer efeitos sobre qualquer gene dentro da célula que está produzindo a molécula do dsRNA. A inibição de expressão gênica do gene-alvo, no inseto-praga, pode resultar em novos traços fenotípicos no inseto-praga.

[00109] A presente invenção provê, em parte, um sistema para liberação dos agentes de controle de insetos pela exposição dos insetos a uma dieta contendo estes agentes de controle da presente invenção. De acordo com uma das concretizações, as moléculas

estabilizadas de dsRNA ou de siR-NA podem ser incorporadas à dieta do inseto ou podem ser sobrepostas sobre o topo da dieta para consumo por insetos. A presente invenção provê também, em parte, um sistema para liberação dos agentes de controle de insetos pela exposição dos insetos a um microorganismo ou hospedeiro, como uma planta contendo os agentes de controle de insetos da presente invenção, por ingestão do microorganismo ou células do hospedeiro ou o conteúdo das células. De acordo com outra concretização, a presente invenção envolve a geração de uma célula transgênica de plantas ou de uma planta que contenha um constructo de DNA recombinante que transcreva as moléculas estabilizadas do dsRNA da presente invenção. Conforme utilizada no presente, a frase "geração de célula transgênica de planta ou de planta" se refere aos métodos que empregam tecnologias de DNA recombinante, prontamente disponíveis na técnica (por exemplo, por Sambrook et al., 1989) para construção de vetores de transformação de plantas que transcrevam as moléculas estabilizadas do dsRNA da presente invenção, visando transformar a célula da planta ou a planta e gerar a célula transgênica da planta ou a planta transgênica que contenha as moléculas estabilizadas do dsRNA.

[00110] Em ainda outra concretização, cepas não-patogênicas e atenuadas de microorganismos podem ser utilizadas como veículo para os agentes de controle de insetos e, nessa ótica, os microorganismos que conduzem estes agentes são referidos também como agentes de controle de insetos. Os microorganismos podem ser construídos para expressar uma sequência de nucleotídeos de um gene-alvo para que produza moléculas de RNA, compreendendo sequências de RNA, homólogas ou complementares das sequências de RNA tipicamente encontradas no interior das células de um inseto. A exposição dos insetos aos microorganismos pode resultar em

ingestão dos microorganismos e regulação negativa de expressão de genes-alvo, mediada, direta ou indiretamente, pelas moléculas do RNA ou fragmento ou derivados deste.

[00111] A presente invenção provê, alternativamente, exposição de um inseto aos agentes de controle de insetos da presente invenção, incorporados em uma mistura pulverizada e aplicada à superfície de um hospedeiro, como um hospedeiro vegetal. Em uma concretização exemplar, a ingestão dos agentes de controle de insetos, por um inseto, libera estes agentes de controle em seu intestino e, subsequentemente nas células no corpo do inseto. Em outra concretização, a infecção do inseto, pelos agentes de controle de insetos, por outros meios como por injeção ou outros métodos físicos, permite também a liberação dos agentes de controle de insetos. Em ainda outra concretização, as próprias moléculas do RNA estão encapsuladas em matriz sintética, como um polímero, e são aplicadas à superfície de um hospedeiro, como uma planta. A ingestão das células hospedeiras, por um inseto, permite a liberação dos agentes de controle ao inseto e resulta em regulação negativa de um gene-alvo no hospedeiro.

[00112] Prevê-se que as composições da presente invenção possam ser incorporadas nas sementes de espécie vegetal, quer como produto de expressão de um gene recombinante, incorporado ao genoma das células de uma planta, quer incorporado em revestimento ou tratamento de semente, aplicado à semente antes de plantio. A célula da planta contendo um gene recombinante é considerada, neste pedido, um evento transgênico.

[00113] Acredita-se que um tratamento pesticida em semente possa prover vantagens significativas quando combinado a evento transgênico que confira proteção contra infestação por coleóptero-praga, incluída no intervalo preferido de efetividade contra uma praga-

alvo. Ademais, acredita-se que há situações, bem-conhecidas daqueles versados na técnica, em que é vantajoso haver estes eventos transgênicos no intervalo preferido de efeti-vidade.

[00114] A presente invenção provê, em parte, um sistema para liberação de agentes de controle de insetos para insetos. As moléculas estabilizadas do dsRNA ou siRNA da presente invenção podem ser introduzidas direta-mente nas células de um inseto, ou introduzidas em cavidade extracelular, espaço intersticial, sistema de linfa, sistema digestivo, na circulação do inse-to através de ingestão oral ou por outros meios que técnicos no assunto po-derão empregar. Métodos de introdução oral podem incluir mistura direta do RNA com alimento do inseto, bem como abordagens de construção nas quais uma espécie, utilizada como comida, é construída para expressar o dsRNA ou siRNA, em seguida alimentada ao inseto a ser afetado. Em uma concretização, por exemplo, as moléculas do dsRNA ou siRNA podem ser incorporadas ou sobrepostas na dieta do inseto. Em outra concretização, o RNA pode ser pulverizado na superfície de uma planta. Em ainda outra concretização, o dsRNA ou siRNA pode ser expresso por microorganismos e estes podem ser aplicados sobre a superfície de uma planta ou introduzi-dos em raiz ou caule, por um meio físico como injeção. Em uma outra con-cretização ainda, uma planta pode ser geneticamente construída para ex-pressar o dsRNA ou siRNA , em quantidade suficiente que mate os insetos que sabidamente infectam a planta.

[00115] Especificamente, na prática da presente invenção em WCR, o dsRNA ou siRNA estabilizado pode ser introduzido no intestino médio, den-tro do inseto, e atingir a inibição desejada dos genes visados. As moléculas do dsRNA ou siRNA podem ser incorporadas a uma dieta ou ser sobrepos-tas sobre a dieta, conforme discutido acima, e podem ser ingeridas pelos insetos. Em qualquer

caso, as moléculas do dsRNA da presente invenção são fornecidas na dieta da praga-alvo. A praga-alvo da presente invenção exibirá pH no trato digestivo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,5, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,7 ou aproximadamente 7,0. O trato digestivo de uma praga-alvo é definido neste pedido como o local, no interior da praga, em que o alimento ingerido por este é descrito a um ambiente que favoreça a absorção das moléculas do dsRNA da presente invenção, sem serem submetidas a pH tão extremo que ocasione a dissociação das pontes de hidrogênio entre as fitas duplas do dsRNA, levando à formação de moléculas de fita simples.

[00116] Prevê-se também que as moléculas do dsRNA, produzidas por síntese química ou enzimática, possam ser formuladas de maneira compatível com práticas comuns utilizadas em agricultura e ser utilizadas sob a forma de produtos pulverizados para controle de infestação por insetos. As fórmulas podem incluir os adesivos e umidificantes apropriados, requeridos para cobertura eficiente de folhas, bem como protetores que protejam o dsRNA contra dano causado por UV. Estes aditivos são comumente empregados na indústria de bioinseticidas e bem-conhecidos de versados na técnica. Essas aplicações poderiam ser combinadas a outras aplicações de inseticida pulverizada, com base biológica ou não, para intensificar a proteção da planta contra dano causado por alimentação de insetos.

[00117] Os presentes inventores contemplam que cepas bacterianas que produzem proteínas inseticidas podem ser utilizadas para produzir dsRNAs, visando controle de insetos. Estas cepas podem exibir propriedades melhoradas de controle de insetos. Uma variedade de hospedeiros bacterianos diferentes pode ser utilizada para produzir dsRNAs de controle de insetos. Exemplos de bactérias

podem incluir *E. coli*, *B. thuringiensis*, *Pseudomonas* sp., *Photobacterium* sp., *Xenorhabdus* sp., *Serratia entomophila* e *Serratia* sp. correlatas, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. laterosporus*, *B. popilliae*, *Clostridium bifermentans* e outras espécies de *Clostridium*, ou outras bactérias gram-positivas, formadoras de esporo. Em certas concretizações, as bactérias podem ser construídas para controle de pragas como mosquitos.

[00118] A presente invenção se refere também aos constructos de DNA recombinante de expressão em microorganismos. Ácidos nucléicos exógenos, dos quais um RNA de interesse é transcrito, podem ser introduzidos em uma célula hospedeira microbiana, como célula bacteriana ou de fungo, empregando métodos conhecidos na técnica.

[00119] As sequências de nucleotídeos da presente invenção podem ser introduzidas em uma ampla variedade de microorganismos hospedeiros procarióticos e eucarióticos para produção de moléculas estabilizadas de dsRNA ou siRNA. O termo "microorganismo" inclui espécies microbianas procarióticas e eucarióticas como bactérias, fungos e algas. Fungos incluem leveduras e fungos filamentosos, entre outros. Exemplos de procarióticos, gram-negativo e gram-positivo, incluem Enterobacteriaceae, como *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* e *Proteus*; Bacillaceae; Rhizobiceae, como *Rhizobium*; Spirillaceae, como fotobactérias, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae, como *Pseudomonas* e *Acetobacter*; Azotobacteraceae, Actinomycetales e Nitrobacteraceae. Entre eucariotes estão fungos, como Phycomycetes e Ascomycetes, os quais incluem levedura, como *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*; e Basidiomycetes, como *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* e similares.

[00120] Para finalidade de proteção de planta contra insetos, um

grande número de microorganismos que, sabidamente, habitam o filoplano (a superfície das folhas de plantas) e/ou a rizoesfera (o solo que circunda raízes de plantas) de uma ampla variedade de cultivares importantes, pode ser também células desejáveis de hospedeiro para manipulação, propagação, armazenamento, liberação e/ou mutagênese dos constructos recombinantes descritos. Estes microorganismos incluem bactérias, algas e fungos. De particular interesse são microorganismos, como bactérias, por exemplo, do *Bacillus* (incluindo as espécies e subespécies *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis kurstaki* HD-73, *B. thuringiensis sotto*, *B. thuringiensis ber-liner*, *B. thuringiensis thuringiensis*, *B. thuringiensis tolworthi*, *B. thuringiensis dendrolimus*, *B. thuringiensis alesti*, *B. thuringiensis galleriae*, *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis subtoxicus*, *B. thuringiensis entomocidus*, *B. thuringiensis tenebrionis* e *B. thuringiensis san diego*); *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Zanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* e *Alcaligenes*; fungos, especialmente leveduras, por exemplo, do gênero *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium*. De particular interesse são as espécies de bactérias da fitosfera, como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes eutrophus* e *Azotobacter vinlandii*; e espécies de levedura da fitosfera, como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odorus*, *Kluyveromyces veronae* e *Aureobasidium pollulans*.

D. Plantas transgênicas

[00121] A presente invenção provê sementes e plantas com um ou mais eventos transgênicos. Combinações de eventos são referidas como eventos transgênicos "sobrepuestos". Estes eventos transgênicos sobrepuestos podem ser direcionados à mesma praga-alvo ou podem ser direcionados a pragas-alvo diferentes. Em uma concretização, uma semente, contando com capacidade para expressar um ácido nucléico, conforme provido neste pedido, possui também a capacidade de expressar pelo menos um outro agente inseticida, incluindo, entre outros, uma molécula de RNA, cuja sequência é derivada da sequência de um RNA expresso em uma praga-alvo e que forma estrutura de RNA de dupla fita ao ser expresso na semente ou células de uma planta derivada da semente, em que a ingestão de uma ou mais células da planta, pela praga-alvo, resulta na supressão de expressão do RNA nas células da praga-alvo.

[00122] Em certas concretizações, uma semente, contando com capacidade para expressar um dsRNA, cuja sequência é derivada de uma praga-alvo, possui também um evento transgênico que confere tolerância a herbicida. Um exemplo benéfico de gene de tolerância a herbicida é aquele que confere tolerância a glifosato, N- (fosfometil) glicina, incluindo a forma de sal de isopropilamina deste herbicida.

[00123] No presente método, a combinação de expressão de uma quantidade inseticida de um dsRNA, no interior das células de uma semente transgênica ou de planta cultivada a partir da semente, acoplada com tratamento da semente ou planta com certos produtos químicos ou proteínas pesticidas, pode ser utilizada para conferir vantagens sinérgicas inesperadas, incluindo eficácia inesperadamente superior de proteção contra dano causado à planta transgênica resultante pela praga-alvo. Em concretizações especiais, o tratamento de uma semente transgênica, capaz de expressar certos

constructos que formam moléculas de dsRNA, cuja sequência é derivada de uma ou mais sequências expressas em larva alfinete de milho, com aproximadamente 100 g a aproximadamente 400 g de pesticida por 100 kg de semente, confere proteção inesperadamente superior contra larva alfine-te de milho. Ademais, acredita-se que estas combinações são efetivas também para proteger as plantas emergentes contra dano causado por outras pragas. As sementes da presente invenção podem ser utilizadas também para diminuir o custo do uso de pesticidas, visto ser utilizado menos pesticida para obter a quantidade requerida de proteção do que quando estes métodos não são empregados. Além disso, uma vez que menos pesticida é utilizada e aplicada antes de plantio e sem aplicação em campo separado, acredita-se que o método em questão é, por conseguinte, mais seguro para o operador e para o meio ambiente e, potencialmente, menos dispendioso do que métodos convencionais.

[00124] Por "sinérgico" pretende-se incluir os efeitos sinérgicos da combinação sobre a atividade pesticida (ou eficácia) da combinação do evento transgênico com o pesticida. No entanto, não se pretende que estes efeitos sinérgicos fiquem limitados à atividade pesticida, porém devem incluir também vantagens inesperadas como alcance aumentado da atividade, perfil vantajoso de atividade, conforme relatado para tipo e quantidade de redução de danos, custo diminuído de pesticida e aplicação, distribuição diminuída no meio ambiente, exposição diminuída do pessoal que produz, manipula e planta sementes de milho e outras vantagens conhecidas de versados na técnica.

[00125] Pesticidas e inseticidas úteis em composições em combinação aos métodos e composições da presente invenção, incluindo tratamentos e revestimentos de sementes, bem como métodos de uso destas composições, podem ser encontrados, por

exemplo, na Patente U.S. 6 551 962, cujo conteúdo é aqui incorporado neste pedido por referência.

[00126] Embora se acredite que tratamentos de sementes possam ser aplicados a semente transgênica em qualquer estado fisiológico, pode ser preferível que a semente encontre-se em estado suficientemente durável que não incorra em danos durante o processo de tratamento. Tipicamente, a semente seria aquela colhida do campo, removida da planta transgênica e separada de qualquer outro material da planta que não fosse semente. A semente seria também, de preferência, biologicamente estável de forma que o tratamento não causasse dano biológico à mesma. Em uma concretização, por exemplo, o tratamento pode ser aplicado à semente de milho, colhida, limpa e desidratada até aproximadamente abaixo de 15% por peso de teor de umidade. Em uma concretização alternativa, esta pode ser uma semente que tenha sido desidratada e preparada com água e/ou outro material e, em seguida, reidratada antes ou durante o tratamento com o pesticida. Dentro das limitações descritas, acredita-se que o tratamento possa ser aplicado à semente em qualquer ocasião entre a colheita e sementeira da semente. Conforme utilizado no presente, o termo "semente não semeada" pretende incluir semente em qualquer período entre a colheita e a sementeira da semente no solo, visando germinação e crescimento da planta. Quando se diz que a semente não semeada é "tratada" com o pesticida, este tratamento não pretende incluir aquelas práticas nas quais o pesticida é aplicado ao solo, em vez de à semente. Por exemplo, estes tratamentos como a aplicação do pesticida em faixas, faixas "em T" ou em sulco, ao mesmo tempo em que a semente é semeada, não são considerados incluídos na presente invenção.

[00127] O pesticida, ou combinação de pesticidas, pode ser aplicado "puro", ou seja, sem diluição ou componentes adicionais. No

entanto, o pesticida é aplicado tipicamente às sementes na forma de pesticida formulado. Esta fórmula pode conter um ou mais componentes desejáveis, incluindo, entre outros, diluentes líquidos, aglutinantes para servir como matriz para o pesticida, espessantes para proteger as sementes durante condições de estresse e plastificantes para melhorar a flexibilidade, adesão e/ou capacidade de distribuir o revestimento.

[00128] Os pesticidas em questão podem ser aplicados a uma semente como componente de revestimento de uma semente. Os métodos e composições para revestimento de sementes, conhecidos na técnica, são úteis quando são modificados pelo acréscimo de uma das combinações de pesticidas, concretizadas da presente invenção. Estes métodos de revestimento e equipamento para sua aplicação são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os} 5 918 413, 5 891 246, 5 554 445, 5 389 399, 5 107 787, 5 080 925, 4 759 945 e 4 465 017. Composições de revestimento de sementes são descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os} 5 939 356, 5 882 713, 5 876 739, 5 849 320, 5 834 447, 5 791 084, 5 661 103, 5 622 003, 5 580 544, 5 328 942, 5 300 127, 4 735 015, 4 634 587, 4 383 391, 4 372 080, 4 339 456, 4 272 417 e 4 245 432, entre outras.

[00129] Os pesticidas úteis no revestimento são aqueles aqui descritos. A quantidade de pesticida, utilizada para tratamento da semente, variará dependendo do tipo de semente e do tipo de ingredientes ativos, porém o tratamento compreenderá o contato das sementes com uma quantidade da combinação de pesticidas com efeito pesticida. Quando a praga-alvo for insetos, esta será uma quantidade do inseticida com efeito inseticida. Conforme utilizada no presente, quantidade com efeito inseticida significa que aquela quantidade de inseticida eliminará insetos-praga em estado larval ou pupal de crescimento, ou reduzirá ou retardará consistentemente a

quantidade de dano produzido por insetos-praga.

[00130] De modo geral, a quantidade de pesticida aplicada à semente no tratamento variará de aproximadamente 10 g a aproximadamente 2000 g do ingrediente ativo do pesticida por 100 kg do peso da semente. De preferência, a quantidade de pesticida variará de aproximadamente 50 g a aproximadamente 1000 g de ingrediente ativo por 100 kg de semente, mais preferencialmente, variará de aproximadamente 100 g a aproximadamente 600 g de ingrediente ativo por 100 kg de semente, e ainda mais preferencialmente, variará de aproximadamente 200 g a aproximadamente 500 g de ingrediente ativo por 100 kg de peso da semente. Alternativamente, foi constatado ser preferível que a quantidade do pesticida seja acima de aproximadamente 60 g do ingrediente ativo do pesticida por 100 kg da semente e, mais preferivelmente, acima de aproximadamente 80 g por 100 kg de semente.

[00131] Os pesticidas utilizados no tratamento não precisam inibir a germinação da semente e devem ser eficazes em proteger a semente e/ou a planta no período de tempo, no ciclo de vida do inseto visado, no qual este causa lesão à semente ou a planta. De modo geral, o revestimento permanecerá eficaz por aproximadamente 0 a 120 dias após a semeadura. Os pesticidas, objeto da invenção, podem ser aplicados à semente sob a forma de revestimento.

[00132] Benefícios providos pela presente invenção podem incluir, entre outros: a facilidade de introdução do dsRNA nas células de insetos, a baixa concentração do dsRNA que pode ser utilizada, a estabilidade do dsRNA e a efetividade da inibição. A possibilidade de usar baixa concentração de dsRNA estabilizado evita várias desvantagens de interferência de antissenso. A presente invenção não está limitada a uso in vitro ou para composições de sequências específicas, para um conjunto particular de genes-alvo, uma parte

particular da sequência de nucleotídeos do gene-alvo ou transgene em particular, ou para um método de liberação especial, ao contrário de algumas disponíveis conhecidas na técnica, como supressão antissenso ou co-supressão. Ademais, a manipulação genética é possibilitada em organismos que não modelos genéticos clássicos.

[00133] Na prática da presente invenção, podem ser conduzidas seleções para assegurar que a presença das sequências de nucleotídeos, transcritas a partir do constructo recombinante, não são seja nociva a células que não pertencem a pragas. Isso pode ser obtido, visando-se genes que exibem um grau pequeno de identidade de sequência com genes correspondentes em uma planta ou animal vertebrado. De preferência, o grau da identidade de sequência é inferior a aproximadamente 80%. Mais preferencialmente, o grau da identidade de sequência é inferior a aproximadamente 70%. O mais preferível é que o grau da identidade de sequência seja inferior a aproximadamente 60%.

[00134] Além de transformação direta de uma planta com um constructo de DNA recombinante, plantas transgênicas podem ser preparadas pelo cruzamento de uma primeira planta, contendo um constructo de DNA recombinante, com uma segunda planta desprovida do constructo. Por exemplo, DNA recombinante para supressão gênica pode ser introduzido em uma primeira linhagem de planta, receptiva à transformação para produzir uma planta transgênica que possa ser cruzada com uma segunda linhagem de planta para integração do DNA recombinante de supressão de gene na segunda linhagem de planta.

[00135] A presente invenção pode ser, em prática, combinada a outros traços de controle de insetos, em uma planta, para serem obtidos traços desejados de intensificação de controle de infestação por inseto. A combinação de traços de controle de insetos,

empregando modos de ação distintos, pode conferir a plantas transgênicas protegidas contra insetos durabilidade superior sobre plantas que abrigam um único traço de controle de insetos, em decorrência de ser menor a probabilidade de que a resistência se desenvolva no campo.

[00136] O mecanismo de atividade inseticida de cristais protéicos do *B. thuringiensis* foi intensamente estudado na década passada. Foi demonstrado que os cristais protéicos são tóxicos para a forma larval do inseto, somente após ingestão da proteína. Na larva de lepidópteros, a presença de pH alcalino e enzimas proteolíticas no intestino médio do inseto solubiliza as proteínas, permitindo, pelo mesmo, a liberação de componentes que são tóxicos para o inseto. Estes componentes tóxicos desorganizam as células do intestino médio, fazem com que o inseto pare de se alimentar e, eventualmente, levam a sua morte. Por esse motivo, toxinas do *B. thuringiensis* comprovaram ser inseticidas efetivas e seguras para o meio ambiente, quando usadas para controlar vários insetos-praga. Insetos coleópteros e hemípteros, e possivelmente dípteros, do gênero *lygus* e outros insetos que picam e sugam exibem pH do intestino ligeiramente ácido e, dessa forma, as toxinas do Bt que são efetivas contra larvas lepidópteros não são efetivas contra estas pragas. Acredita-se também que o pH ligeiramente ácido do intestino destas pragas seja menos agressivo às composições da presente invenção, e sem pretender estar limitado a qualquer teoria em particular, é possível que o pH alcalino do intestino de larvas lepidópteras seja um motivo que contribua para que tentativas anteriores em exibir a eficácia do dsR-NA tenham falhado (Fire et al. Patente U.S. Nº 6 506 559; Mesa et al. Publicação de Patente Nº US2003/0150017; Rajagopal et al., 2002; Tabara et al., 1998). Acredita-se, por conseguinte, que os métodos do dsRNA, descritos neste pedido, devem ser

preferencialmente utilizados em composições e em plantas para controle de insetos coleópteros, dípteros, hemípteros, do gênero *lygus* e insetos que picam e sugam. Os métodos e composições descritos neste pedido são especialmente úteis quando se destinam a genes para supressão em insetos que exibem pH de intestino de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,5, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,7, de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,6 ou aproximadamente 7,0. No entanto, também se pretende que insetos e outras espécies de pragas que exibem pH de intestino de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 11,0 ou de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,0, como larvas de insetos lepidópteros, sejam incluídos no escopo da presente invenção. Isso é particularmente verdadeiro quando um dsRNA, específico para inibição de um gene em larvas lepidópteras é fornecido na dieta das larvas, juntamente com uma ou mais proteínas do Bt, as quais seriam comumente tóxicas para aquelas larvas lepidópteras quando providas em nível no limiar ou acima. A presença de uma ou mais toxinas do Bt, tóxicas para a mesma espécie de inseto, reduziria efetivamente o pH do intestino, propiciando um ambiente estável para as moléculas de RNA de fita dupla exercerem seus efeitos de supressão de um gene-alvo no inseto-praga.

[00137] Prevê-se que a combinação de certos constructos de dsRNA estabilizado, com um ou mais genes de proteínas de controle de insetos, resultará em sinergias que intensificarão o fenótipo de controle de insetos de uma planta transgênica. Bioensaios de insetos, empregando dieta artificial ou inteiramente de tecidos de plantas, podem ser utilizados para definir dose-respostas, para mortalidade

larval ou inibição de crescimento, usando tanto o dsRNA como proteínas de controle de insetos. Versados na técnica podem testar misturas de moléculas de dsRNA e proteínas de controle de inseto em bioensaio para identificar combinações de ingredientes ativos sinérgicos e desejáveis para emprego em plantas protegidas contra insetos (Tabashnik, 1992). A sinergia em eliminação de insetos-praga foi relatada entre diferentes proteínas de controle de insetos (para revisão, vide Schnepf et al., 1998). Prevê-se que ocorrerá sinergia entre certos dsRNAs e entre certos dsRNAs e certas proteínas de controle de insetos.

[00138] A invenção se refere também a produtos comerciáveis, contendo uma ou mais sequências da presente invenção, e produzidos a partir de uma planta ou semente recombinante, contendo uma ou mais das seqüências de nucleotídeos da presente invenção, que são especificamente contemplados como concretizações da presente invenção. Produto comerciável contendo uma ou mais das sequências da presente invenção pretende incluir, entre outros, comidas, óleos, grãos moídos ou inteiros ou sementes de uma planta, ou qualquer produto alimentício compreendendo qualquer comida, óleo ou grão moído ou inteiro de uma planta ou semente recombinante, contendo uma ou mais sequências da presente invenção. A detecção de uma ou mais sequências da presente invenção, em um produto ou subproduto comerciável, contemplados neste pedido, é evidência de fato de que o produto ou subproduto comerciável é composto por uma planta transgênica, criada para expressar uma ou mais seqüência de nucleotídeos da presente invenção, visando o controle de infestação por inseto, empregando métodos de supressão gênica mediada por dsRNA.

D. Obtenção de ácidos nucléicos

[00139] A presente invenção provê um método de obtenção de

ácido nucléico, compreendendo uma sequência de nucleotídeos para produção de dsRNA ou siRNA. Em uma concretização, este método compreende: (a) sondagem de biblioteca de cDNA ou gDNA com sonda de hibridização, compreendendo toda ou parte de uma sequência de nucleotídeos, ou ho-móloga desta, proveniente de um inseto visado; (b) identificação de clone de DNA que se hibridize com a sonda de hibridização; (c) isolamento do clone de DNA, identificado na etapa (b); e (d) seqüenciamento do fragmento do cDNA ou gDNA que compreende o clone isolado na etapa (c), em que a molécula seqüenciada de ácido nucléico transcreve toda ou parte substancial da sequência de nucleotídeos do RNA, ou de homólogo desta.

[00140] Em outra concretização, um método da presente invenção de obtenção de fragmento de ácido nucléico, compreendendo uma sequência de nucleotídeos para produção de parte substancial de um dsRNA ou siRNA compreende: (a) síntese de um primeiro e segundo iniciador de oligonucleotídeos, correspondentes a uma parte de uma das sequências de nucleotídeos de um inseto visado; e (b) amplificação da cópia do cDNA ou gDNA em um vetor de clonagem, empregando o primeiro e segundo iniciador de oligonucleotídeos da etapa (a), em que a molécula amplificada de ácido nucléico transcreve parte substancial de um dsRNA ou siRNA da presente invenção.

[00141] Na prática da presente invenção, um gene-alvo pode ser derivado de uma larva alfinete de milho (CRW), como WCR ou SCR, ou de qual-quer espécie de inseto que cause danos às plantas de cultivo e perdas subseqüentes de rendimento. Contempla-se que vários critérios podem ser empregados na seleção de genes-alvo preferidos. Este é um gene cujo produto protéico possui uma taxa rápida de utilização, de forma que a inibição pelo dsRNA resultará em diminuição rápida em níveis protéicos. Em certas concretizações, é

vantajoso selecionar um gene para o qual uma queda pequena, em nível de expressão, resulte em efeitos deletérios para o inseto. Se for desejado atingir uma ampla faixa de espécies de insetos, é selecionado um gene que é altamente preservado entre as espécies. Por outro lado, para fins de conferir especificidade, em certas concretizações da invenção, é selecionado um gene que contenha regiões que são pouco preservadas entre espécies individualizadas de insetos, ou entre insetos e outros organismos. Em certas concretizações, pode ser desejável selecionar um gene que não possua homólogos conhecidos em outros organismos.

[00142] Conforme utilizado no presente, o termo "derivado de" se refere a uma sequência especificada de nucleotídeos que pode ser obtida de uma fonte especificada ou espécie em particular, embora não necessária e diretamente daquela fonte ou espécie especificada.

[00143] Em uma concretização, é selecionado um gene que se expressa no intestino do inseto. Genes visados que se expressam no intestino evitam que o dsRNA precise ser disseminado no inseto. Genes-alvo para uso na presente invenção podem incluir, por exemplo, aqueles que compartilham homologia substancial com as sequências de nucleotídeos de genes conhecidos que se expressam no intestino e que codificam componentes protéicos da V-ATPase protônica de vacúolos e da membrana plasmática (Dow et al., 1997; Dow, 1999). Esse complexo protéico é a única fonte de energia do transporte iônico epitelial e é responsável pela alcalinização do lúmen do intestino médio. A V-ATPase é expressa também no tubo de Malpighi, um desdobramento do intestino posterior do inseto que atua em equilíbrio hídrico e desintoxicação de compostos estranhos de maneira análoga ao órgão renal de um mamífero. Em outra concretização, a V-ATPase pode ser Vha68-2, ou homólogo ou ortólogo desta (por exemplo, conforme encontrada na SEQ ID NO: 821).

[00144] Em outra concretização, é selecionado um gene que está essencialmente envolvido no crescimento, desenvolvimento e reprodução de um inseto. Exemplos do gene incluem, entre outros, gene CHD3, gene da β -tubulina e um gene que codifica uma proteína supostamente envolvida em transporte. O gene CHD3 na *Drosophila melanogaster* codifica uma proteína com atividade sobre a DNA-helicase, dependente de ATP, a qual está envolvida em montagem/desmontagem de cromatina no núcleo. Foram encontradas sequências semelhantes em diversos organismos, como *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* e *Saccharomyces cerevisiae*. A família de genes da beta-tubulina codifica proteínas associadas a microtúbulos, constituintes do citoesqueleto celular. Foram encontradas sequências correlatas em diversos organismos, como *C. elegans* e *Manduca sexta*. Proteínas previstas como subunidades do complexo sortido endossômico, exigidas para transporte (ESCRT)-III (Babst et al., 2002), por exemplo, Dv49, são encontradas em diversos organismos, incluindo mamíferos, levedura e insetos, como *D. virgifera*. Outra proteína relacionada a transporte é a proteína β '-coatomer, abreviada como β 'Cop, que codifica um produto envolvido em transporte retrógrado (Golgi para RE). Sequências semelhantes ou previstas foram identificadas em *C. elegans* e *D. virgifera*, por exemplo, Dv248 (SEQ ID NO).

[00145] Outros genes que podem ser utilizados como alvo na presente invenção podem incluir, por exemplo, aqueles que desempenham papel importante na viabilidade, crescimento, desenvolvimento, reprodução e possibilidade de contaminação. Estes genes podem ser genes de manutenção de metabolismo, fatores de transcrição e específicos para insetos ou mutações de inativação gênica letais em *Drosophila*. Os genes-alvo de uso na presente invenção podem ser também aqueles de outros organismos, por

exemplo, de nematódeos (por exemplo, *C. elegans*). Adicionalmente, as se-quências de nucleotídeos de uso na presente invenção podem ser deriva-das também de genes de plantas, vírus, bactérias ou fungos, cujas funções tenham sido estabelecidas de acordo com literatura, e as sequências de nu-cleotídeos que compartilham semelhança substancial com os genes-alvo, no genoma de um inseto. De acordo com uma característica da presente invenção para controle de WCR, as sequências-alvo podem ser derivadas essencialmente do inseto visado da WCR. Alguns exemplos destas se-quências, provenientes da biblioteca de cDNA de WCR, que codificam pro-teínas do *D. virgifera*, ou fragmentos destas, homólogos de proteínas co-nhecidas, podem ser encontradas na Listagem de Sequências. As molécu-las de ácido nucléico de homólogos que codificam proteínas conhecidas do *D. virgifera* são conhecidas (Andersen et al., Pedido de Patente U.S. Serial Nº 10/205 189).

[00146] Para fins da presente invenção, as moléculas do dsRNA ou siRNA podem ser obtidas do CRW por amplificação de reação em cadeia de polimerase (PCR®) de sequências de gene-alvo de CRW, derivado da bibli-oteka de gDNA ou cDNA, ou partes desta, de larva alfinete de milho. As lar-vas WCR podem ser preparadas, empregando métodos conhecidos de qualquer versado na técnica, e o DNA/RNA pode ser extraído. Larvas com tamanhos variando de 1º instar a CRWs, completamente desenvolvida, po-dem ser utilizadas, nesta invenção, para extração de DNA/RNA. As bibliote-cas de DNA genômico ou de cDNA, geradas a partir de WCR, podem ser utilizadas na amplificação por PCR® para produção do RNA ou siRNA.

[00147] Os genes-alvo podem ser, então, amplificados por PCR® e se-quenciados, empregando os métodos à disposição na técnica. Versados na técnica poderão modificar as condições da PCR® para assegurar que o me-lhor produto da PCR® seja formado. O produto

confirmado da PCR® pode ser utilizado como modelo para transcrição in vitro, gerando RNA sentido e antissenso RNA com os promotores mínimos incluídos.

[00148] Os presentes inventores contemplam que sequências de ácido nucléico, identificadas e isoladas de qualquer espécie no reino de insetos, poderão ser utilizadas na presente invenção para controle de WCR e de outros insetos visados. Em uma característica da presente invenção, o ácido nucléico pode ser derivado de espécies de coleópteros. Especificamente, o ácido nucléico pode ser derivado de besouro crisomelídeo, pertencente do gênero *Diabrotica* (Coleoptera, Chrysomelidae), e, mais especificamente, as moléculas de ácido nucléico da presente invenção podem ser derivadas de espécies do grupo virgífera. O mais específico é que as moléculas de ácido nucléico da presente invenção sejam derivadas do *Diabrotica virgífera* LeConte, normalmente referida como WCR. Os ácidos nucléicos isolados podem ser úteis, por exemplo, para identificar um gene-alvo e construir um vetor recombinante que produza os dsRNAs ou siRNAs estabilizados da presente invenção, para proteção de plantas contra infestações por insetos do tipo WCR.

[00149] Por conseguinte, em uma concretização, a presente invenção compreende sequências de nucleotídeos, isoladas e purificadas, de WCR ou *Lygus* que podem ser utilizadas como os agentes de controle de insetos. As sequências de nucleotídeos, isoladas e purificadas, podem compreender aquelas expostas na listagem de sequências.

[00150] Os ácidos nucléicos de WCR ou de outros insetos que podem ser utilizados na presente invenção podem compreender também moléculas de ácido nucléico de Unigenes e EST, isoladas e substancialmente purificadas, ou moléculas de fragmentos de ácidos nucléicos destes. Moléculas de ácido nucléico de EST podem codificar

partes significativas, ou de fato a maioria, dos polipeptídeos. Alternativamente, os fragmentos podem conter oligonucleotídeos menores com de aproximadamente 15 a aproximadamente 250 resíduos de nucleotídeos e, mais preferencialmente, de aproximadamente a aproximadamente 30 resíduos de nucleotídeos. Alternativamente, as moléculas de ácido nucléico para uso na presente invenção podem ser provenientes de bibliotecas de cDNA de WCR, ou de qualquer outro coleóptero-praga.

[00151] Moléculas de ácido nucléico, e fragmentos deste, de WCR ou de outras espécies de coleóptero-praga podem ser empregadas para obter outras moléculas de ácido nucléico de outras espécies, para serem utilizadas, nesta invenção, para produzir as moléculas desejadas de dsRNA e de siRNA. Estas moléculas de ácido nucléico incluem moléculas de ácido nucléico que codificam a sequência codificadora completa de uma proteína e de promotores e sequências que flanqueiam estas moléculas. Ademais, estas moléculas de ácido nucléico incluem moléculas de ácido nucléico que codificam membros da família do gene. Estas moléculas podem ser obtidas prontamente, empregando as moléculas de ácido nucléico descritas acima, ou fragmentos deste, para seleção em, por exemplo, bibliotecas de cDNA ou gDNA de *D. v. virgífera* ou outros coleópteros, ou de *Lygus hesperus*. Métodos para criação destas bibliotecas são bem conhecidos na técnica.

[00152] Conforme utilizada no presente, a frase "sequência codificado-ra", "sequência estrutural de nucleotídeos" ou "molécula estrutural de ácido nucléico" se refere a uma sequência de nucleotídeo que é traduzida em polipeptídeo, geralmente via mRNA, quando posta sob controle de sequências reguladoras apropriadas. Os limites da sequência codificadora são determinados por um códon de início de tradução, no terminal 5', e um códon de parada de tradução no

terminal 3'. Uma sequência codificadora por incluir, entre outras, sequência de nucleotídeos de DNA genômico, DNA, cDNA, EST e sequências de nucleotídeos recombinantes.

[00153] O termo "DNA recombinante" ou "sequência de nucleotídeos recombinante" se refere a DNA que contenha uma modificação construída por manipulação via mutagênese, enzimas de restrição e similar.

[00154] A informação, referente às sequências da maioria dos genes ou do fenótipo resultante de mutação de genes especificados, pode ser limitada para muitos dos insetos que são possíveis alvos de controle pela presente invenção. Por conseguinte, os presentes inventores contemplam que a seleção de genes apropriados de insetos-praga para uso na presente invenção pode ser obtida pelo uso de informação disponível, resultante de estudo dos genes correspondentes, em modelo de organismo como de *Drosophila*, de algumas outras espécies de inseto, ou até mesmo de espécies de nematódeos, espécies de fungos, espécies de plantas, nas quais os genes tenham sido caracterizados. Em alguns casos, será possível obter a sequência de um gene correspondente de um inseto-alvo por pesquisa em bancos de dados como o GenBank, empregando o nome do gene ou da sequência de, por exemplo, *Drosophila*, outro inseto, um nematódeo, um fungo ou uma planta dos quais o gene tenha sido clonado. Uma vez obtida a sequência, PCR® pode ser utilizada para amplificar um segmento devidamente selecionado do gene no inseto a ser utilizado na presente invenção.

[00155] A fim de obter um segmento de DNA do gene correspondente em espécies de inseto, podem ser criados iniciadores por PCR®, com base na sequência encontrada em WCR ou outros insetos, dos quais o gene tenha sido clonado. Os iniciadores são criados para amplificar um segmento de DNA de extensão suficiente

para ser utilizado na presente invenção. O DNA (DNA genômico ou cDNA) é preparado a partir de espécies de insetos e os iniciadores da PCR® são utilizados para amplificar o segmento do DNA. As condições da amplificação são selecionadas de forma que esta ocorra mesmo se os iniciadores não combinarem exatamente com a sequência visada. Alternadamente, o gene (ou parte do mesmo) pode ser clo-nado a partir de uma biblioteca de gDNA ou de cDNA, preparada a partir de espécies de inseto-praga, empregando o gene do WCR ou de gene conhecido de outro inseto, como sonda. Técnicas para condução de PCR® e clo-nagem, a partir de bibliotecas, são conhecidas. Maiores detalhes do processo, pelo qual segmentos de DNA, de espécies de inseto-praga visadas, podem ser isolados com base na sequência de genes previamente clonados do WCR ou de outras espécies de insetos, são fornecidos nos Exemplos. Qualquer versado na técnica reconhecerá que uma variedade de técnicas pode ser utilizada para isolar segmentos de gene que correspondem a genes previamente isolados de outras espécies.

[00156] Se um inseto for o alvo, como praga, para presente invenção, estas pragas incluem, entre outras: da ordem de Lepidópteros, por exemplo, *Acleris* spp., *Adoxophyes* spp., *Aegeria* spp., *Agrotis* spp., *Alabama argillaceae*, *Amylois* spp., *Anticarsia gemmatilis*, *Archips* spp., *Argyrotaenia* spp., *Autographa* spp., *Busseola fusca*, *Cadra cautella*, *Carposina nipponensis*, *Chilo* spp., *Choristoneura* spp., *Clysia ambiguella*, *Cnaphalocrocis* spp., *Cnephasia* spp., *Cochylis* spp., *Coleophora* spp., *Crocidolomia binotalis*, *Cryptophlebia leucotreta*, *Cydia* spp., *Diatraea* spp., *Diparopsis castanea*, *Earias* spp., *Ephestia* spp., *Eucosma* spp., *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis* spp., *Euxoa* spp., *Grapholita* spp., *Hedya nubiferana*, *Heliothis* spp., *Hellula undalis*, *Hyphantria cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Leucoptera scitella*, *Lithocolletis* spp., *Lobesia*

botrana, *Lymantria* spp., *Lyonetia* spp., *Malacosoma* spp., *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Operophtera* spp., *Ostrinia Nubilalis*, *Pammene* spp., *Pandemis* spp., *Panolis flammea*, *Pectinophora gossypiella*, *Phthorimaea operculella*, *Pieris rapae*, *Pieris* spp., *Plutella xylostella*, *Prays* spp., *Scirpophaga* spp., *Sesamia* spp., *Sparganothis* spp., *Spodoptera* spp., *Synanthedon* spp., *Thaumetopoea* spp., *Tortrix* spp., *Trichoplusia ni* e *Yponomeuta* spp.;

da ordem de Coleoptera, por exemplo,

Agriotes spp., *Anthonomus* spp., *Atomaria linearis*, *Chaetocnema tibialis*, *Cosmopolites* spp., *Curculio* spp., *Dermestes* spp., *Diabrotica* spp., *Epilachna* spp., *Eremnus* spp., *Leptinotarsa decemlineata*, *Lissorhynchus* spp., *Melolontha* spp., *Oryzaephilus* spp., *Otiorhynchus* spp., *Phlyctinus* spp., *Popillia* spp., *Psylliodes* spp., *Rhizopertha* spp., *Scarabeidae*, *Sitophilus* spp., *Sitotroga* spp., *Tenebrio* spp., *Tribolium* spp. e *Trogoderma* spp.;

da ordem Orthoptera, por exemplo,

Blatta spp., *Blattella* spp., *Gryllotalpa* spp., *Leucophaea maderae*, *Locusta* spp., *Periplaneta* spp. e *Schistocerca* spp.;

da ordem Isoptera, por exemplo,

Reticulitermes spp.;

da ordem Psocoptera, por exemplo,

Liposcelis spp.;

da ordem Anoplura, por exemplo,

Haematopinus spp., *Linognathus* spp., *Pediculus* spp., *Pemphigus* spp. e *Phylloxera* spp.;

da ordem Mallophaga, por exemplo,

Damalinea spp. e *Trichodectes* spp.;

da ordem Thysanoptera, por exemplo,

Franklinella spp., *Hercinothrips* spp., *Taeniothrips* spp., *Thrips palmi*, *Thrips tabaci* e *Scirtothrips aurantii*;

da ordem Heteroptera, por exemplo,

Cimex spp., Distantiella theobroma, Dysdercus spp., Euchistus spp., Eurygaster spp., Leptocorisa spp., Nezara spp., Piesma spp., Rhodnius spp., Sahlbergella singularis, Scotinophara spp., Triatoma spp., família da Miridae spp., como Lygus hesperus e Lygus lineoloris, família da Lygaeidae spp. como Blissus leucopterus e família da Pentatomidae spp.;

da ordem Homoptera, por exemplo,

Aleurothrixus floccosus, Aleyrodes brassicae, Aonidiella spp., Aphididae, Aphis spp., Aspidiotus spp., Bemisia tabaci, Ceroplaster spp., Chrysomphalus aonidium, Chrysomphalus dictyospermi, Coccus hesperidum, Empoasca spp., Eriosoma larigerum, Erythroneura spp., Gascardia spp., Laodelphax spp., Lacanium corni, Lepidosaphes spp., Macrosiphus spp., Myzus spp., Neohottetix spp., Nilaparvata spp., Paratoria spp., Pemphigus spp., Planococcus spp., Pseudaulacaspis spp., Pseudococcus spp., Psylla spp., Pulvinaria aethiopica, Quadraspidiotus spp., Rhopalosiphum spp., Saissetia spp., Scaphoideus spp., Schizaphis spp., Sitobion spp., Trialeurodes vaporariorum, Trioza erythrae e Unaspis citri;

da ordem Hymenoptera, por exemplo,

Acromyrmex, Atta spp., Cephus spp., Diprion spp., Diprionidae, Gilpinia polytoma, Hoplocampa spp., Lasius spp., Monomorium pharaonis, Neodiprion spp., Solenopsis spp. e Vespa spp.;

da ordem Diptera, por exemplo,

Aedes spp., Antherigona soccata, Bibio hortulanus, Calliphora erythrocephala, Ceratitis spp., Chrysomyia spp., Culex spp., Cuterebra spp., Dacus spp., Drosophila melanogaster, Fannia spp., Gastrophilus spp., Glossina spp., Hypoderma spp., Hyppobosca spp., Liriomyza spp., Lucilia spp., Melanagromyza spp., Musca spp., Oestrus

spp., Orseolia spp., Oscinella frit, Pegomyia hyoscyami, Phorbia spp., Rhagoletis pomonella, Sciara spp., Stomoxys spp., Tabanus spp., Tannia spp. e Tipula spp.,

da ordem Siphonaptera, por exemplo,

Ceratophyllus spp. und Xenopsylla cheopis e

da ordem Thysanura, por exemplo,

Lepisma saccharina.

[00157] Foi constatado que a presente invenção é particularmente efeti-va quando o inseto-praga pertence a Diabrotica spp., e especialmente quando este é Diabrotica virgifera virgifera (larva alfinete do milho ocidental, WCR), Diabrotica barberi (larva alfinete do milho do Norte, NCR), Diabrotica virgifera zea (Mexican Corn Rootworm, MCR), Diabrotica balteata (Brazilian Corn Rootworm (BZR) ou Brazilian Corn Rootworm complex (BCR), consti-tuído por Diabrotica viridula e Diabrotica speciosa) ou Diabrotica undecim-punctata howardi (larva alfinete do milho do Sul, SCR).

Exemplos

[00158] Os inventores desta invenção identificaram meios para o contro-le de infestação por coleóptero-praga pelo fornecimento de moléculas de ácido ribonucleico de fita dupla na dieta de pragas. Surpreendentemente, os inventores constataram que moléculas de ácido ribonucleico de duplo filamento, que atuam na ingestão pela praga, inibem uma função biológica na praga, resultando em um ou mais dos seguintes atributos: redução na alimentação pela praga, redução na viabilidade da praga, morte da praga, inibição da diferenciação e desenvolvimento da praga, ausência ou ca-pacidade reduzida para reprodução sexual pela praga, formação de múscu-lo, produção de hormônio juvenil, regulação de hormônio juvenil, regulação e transporte iônico, manutenção de potencial de membrana celular, biossín-tese de aminoácidos, degradação de aminoácidos,

produção de esperma, síntese de feromônio, sensibilidade a feromônio, formação de antena, formação de asa, formação de perna, desenvolvimento e diferenciação, formação de ovo, maturação larval, produção de enzimas digestivas, síntese de hemolinfa, manutenção de hemolinfa, neurotransmissão, divisão celular, metabolismo energético, respiração, apoptose e qualquer componente de estrutura do citoesqueleto de células eucarióticas, como, por exemplo, actinas e tubulinas. Qualquer um ou qualquer combinação destes atributos pode resultar em inibição efetiva de infestação por praga e, no caso de praga de planta, inibição de infestação da planta. Por exemplo, quando utilizada em composição de dieta, contendo quantidade inibidora suficiente para a praga de uma ou mais moléculas de ácido ribonucleico de fita dupla, fornecida topicamente para uma planta, como em tratamento de semente, aplicação em solo em torno da planta, ou quando produzida por uma planta a partir de molécula de DNA recombinante, presente nas células de uma planta, a infestação da planta por praga é inesperada e radicalmente reduzida. Os Exemplos aqui descritos abaixo ilustram a invenção quando aplicada a uma única praga. No entanto, o versado na técnica reconhecerá que os métodos, fórmulas e ideias, apresentados nos Exemplos, não pretendem restringir e podem ser aplicados a todas as espécies de coleópteros-praga que tenham como fonte de consumo alimentos que podem ser formulados de forma a conter uma quantidade suficiente de um agente inibidor da praga, consistindo em, pelo menos, uma ou mais moléculas de RNA de fita dupla, exemplificadas neste pedido, visando suprimir alguma característica essencial ou função na praga.

Exemplo 1

Identificação de sequências de nucleotídeos alvo para preparo do dsRNA útil para controle de larvas alfinete de milho.

[00159] Bibliotecas de cDNA da larva alfinete de milho (LIB149, LIB

150, LIB3027, LIB3373) foram criadas a partir de larvas completas, pupa e de seções dissecadas de intestino médio, tendo sido obtida informação referente a sequências de nucleotídeos (vide Andersen et al., Pedido de Patente U.S. Serial Nº 10/205 189, depositado em 24 de julho de 2002, aqui incorporada, em sua totalidade, por referência neste pedido). Além disso, foram criadas bibliotecas de cDNA a partir de larvas completas em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes tempos, em cada estágio de desenvolvimento, a fim de maximizar o número de sequências EST diferentes da espécie *Diabrotica*. As bibliotecas LIB5444 e LIB5462 foram criadas a partir de pools de mRNA, obtidos de larvas de larva alfinete do milho ocidental em primeiro (1 grama) e terceiro (2,9 gramas) instar. Os insetos colhidos foram rapidamente congelados por inserção em nitrogênio líquido. Os insetos foram triturados em argamassa e almofariz e mantidos em -20°C, ou menos, por resfriamento em gelo seco e/ou com o acréscimo de nitrogênio líquido à argamassa até que o tecido fosse triturado e transformado em pó fino. O RNA foi extraído empregando o reagente TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Poli A+ RNA foi isolado do preparado de RNA total, empregando Oligo dT DYNABEADS (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Foi criada uma biblioteca de cDNA, a partir do Poli A+ RNA, empregando o Sistema de Plasmídeo SuperScript™ (Invitrogen). O cDNA foi fracionado, de acordo com tamanho, empregando cromatografia. A quarta e quinta fração foram coletadas e unidas no vetor pSPORT1 (Life Technologies Inc., Gaithersburg MD), entre os sítios de reconhecimento de restrição de endonucleases SalI e NotI, e transformados em células eletro-competentes DH10B de *E. coli*, por eletroporação. A biblioteca das larvas em primeiro instar produziu aproximadamente 420.000 unidades formadoras de colônias. A biblioteca de larvas em terceiro instar produziu aproximadamente

2,78 × 10⁶ unidades formadoras de colônia. As colônias das LIB149 e LIB150 foram lavadas e retiradas das placas, misturadas até uniformidade por vórtice rápido e reunidas em tampão Tris-EDTA. Metade da lavagem foi levada a glicerol a 10%, separada em alíquotas em criofrascos e armazenadas a -70°C. A outra metade foi utilizada para produzir DNA de plasmídeo, empregando uma coluna midi-prep de Quiagen de purificação, ou seu equivalente. O DNA purificado de plasmídeo foi separado em alíquotas que foram colocadas em tubos de microcentrifugação e armazenadas a 20°C.

[00160] As colônias de *Diabrotica virgifera* das bibliotecas de cDNA LIB5444 e LIB5462 foram amplificadas individualmente em meio de alta viscosidade. Aproximadamente 200.000 unidades formadoras de colônias, da LIB5444, e 600.000 unidades formadoras de colônia da LIB5462 foram misturadas em um prato de agitação, separadamente, em 500 ml de meio LB, contendo 0,3% de SeaPrep agarose® e 50 mg/l de carbenecilina a 37°C e, em seguida, resfriadas rapidamente em banho de água/gelo por 1 hora, permitindo uma suspensão uniforme das colônias de bactéria. As bibliotecas inoculadas foram, em seguida, cultivadas a 30°C por 42 horas. Após a incubação, as células foram misturadas por 5 minutos em prato de agitação. O meio foi transferido, em seguida, para dois tubos de centrifugação de 250 ml. As células bacterianas foram transformadas em péletes em 10.000 x g por 10 minutos. O meio foi removido dos tubos e as células ressuspensas em 20 ml, no total, de meio LB com 50 mg/l de carbenecilina. Dimetil sulfoxido foi acrescentado a 10% para manter as células congeladas. Ambas as bibliotecas foram amplificadas até titulação final de 10⁸ unidades formadoras de colônia por mililitro. Amostras do cDNA de *Diabrotica virgifera* das bibliotecas LIB5444 e LIB5462 foram combinadas e ajustadas até concentração de DNA de aproximadamente 1,25 microgramas por microlitro em água estéril

destilada e deionizada e separadas em alíquotas em vinte e cinco criofrascos, cada um deles contendo aproximadamente 8,75 microgramas de DNA. Estas amostras foram depositadas pelo(s) requerente(s)/inventores junto à American Type Culture Collection (ATCC), localizada em 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, EUA ZIP 20110-2209, em 10 de junho de 2004 e identificadas como LIB5444/62. A ATCC forneceu ao Requerente um comprovante do depósito, designando o N^o de Acesso de Depósito PTA-6072 da ATCC.

[00161] Foram preparadas bibliotecas de cDNA de alto peso molecular de larva alfinete de milho, ou seja LIB5496 e LIB5498, essencialmente conforme descrito acima para produção de bibliotecas de cDNA de larva alfinete de milho. As bibliotecas LIB5496 e LIB5498 foram criadas, respectivamente, a partir de pools de mRNA, obtidos de larvas de larva alfinete do milho ocidental em primeiro (1 grama) e segundo e terceiro (1 grama) instar. Resumidamente, os insetos foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido. Os insetos congelados foram reduzidos a pó fino, por trituração em argamassa e almofariz. Foi extraído RNA empregando o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Poli A+ RNA foi isolado do preparado de RNA total, utilizando Oligo dT DYNABEADS (Invitrogen). Foi feita uma biblioteca de cDNA de alto peso molecular, a partir de 20 microgramas de Poli A+ RNA, empregando o Sistema de Plasmídeo SuperScrip-t™ (Invitrogen). O cDNA foi dividido em frações em gel de agarose a 1% em TAE, e cDNA, incluído no intervalo de 1 Kb a 10 Kb, foi coletado e ligado ao vetor pSPORT1 entre os sítios de restrição Sal1 e Not1 e transformado em células eletro-competentes DH10B de E. coli por eletroporação. A LIB5496 rendeu, no total, título de aproximadamente $3,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia, enquanto que a LIB5498, este título total foi de

aproximadamente $1,0 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia. As colônias das bibliotecas LIB5496 e LIB5498 de cDNA de alto peso molecular da larva alfinete de milho foram amplificadas, individualmente, em meio de alta viscosidade. Aproximadamente 600.000 unidades formadoras de colônia, da LIB5496 e LIB5498, foram misturadas em prato de agitação, separadamente, em 500 ml de meio LB, contendo 0,3% de SeaPrep agarose® e 50 mg/l de carbenecilina a 37°C e, em seguida, resfriadas rapidamente em banho de água/gelo por 1 hora, permitindo suspensão uniforme das colônias de bactérias. As bibliotecas foram cultivadas em seguida a 30°C por 42 horas. Após a incubação, as células foram misturadas por 5 minutos em prato de agitação. O meio foi transferido, em seguida, para dois tubos de centrifugação de 250 ml. As células bacterianas foram transformadas em péletes em 10.000 x g por 10 minutos. O meio foi removido dos tubos e as células resuspensas em 20 ml, no total, de meio LB com 50 mg/l de carbenecilina. Dimetil sulfoxido foi acrescentado a 10% para manter as células congeladas. Ambas as bibliotecas foram amplificadas até titulação final de 108 unidades formadoras de colônia por mililitro. Foi obtida informação sobre sequência de cDNA inserido a partir das bibliotecas de plasmídeo, específicas para espécie de larva alfinete de milho.

[00162] As bibliotecas de larva alfinete de Andersen et al., juntamente com sequências adicionais das bibliotecas LIB5444 e LIB5462, produziram inicialmente em torno de 18.415 sequências individualizadas de EST, consistindo em aproximadamente $1,0 \times 10^7$ resíduos de nucleotídeos. O comprimento médio de uma sequência EST foi de aproximadamente 586 resíduos de nucleotídeos. Estas sequências EST foram submetidas a algoritmos bioinformáticos que resultaram na montagem de sequências contíguas, referidas neste pedido como sequências de UNIGENE, e sequências individualizadas

EST que não podiam ser compiladas por sobreposição de identidade com outras sequências EST, referidas neste pedido como singletons. As bibliotecas LIB5444 e LIB5462 foram seqüenciadas em seguida com mais profundidade, resultando em sequências EST individualizadas adicionais. Foram selecionadas sequências EST, obtidas de bibliotecas, ou sejam, LIB149, LIB150, LIB3027, LIB3373, LIB5444, LIB5462, LIB5496 e LIB5503, para investigação posterior em bioensaios de alimentação, conforme descritos abaixo, e as sequências correspondentes são fornecidas na listagem de sequências.

[00163] As sequências EST, isoladas de bibliotecas de cDNA de CRW, foram montadas, quando possível, em conjuntos UNIGENE e estas seqüências montadas em Unigene estão incluídas na listagem de sequências. UNIGENE é um conglomerado, orientado por gene, formado da sobreposição de sequências individualizadas EST, em regiões em que há identidade de sequência, para formar uma sequência maior. Pontius et al. (2003). Cada sequência de nucleotídeos, conforme expostas na listagem de sequências, foi analisada para identificação de presença de estruturas de leitura aberta. A informação sobre sequência de aminoácidos, deduzida de estruturas de leitura aberta, foi comparada com a informação disponível de sequências conhecidas de aminoácidos em bancos de dados públicos, a fim de ser deduzida a extensão da identidade ou semelhança de sequências de aminoácidos em relação àquelas sequências de aminoácidos. A função biológica, se constante, associada a sequências conhecidas de aminoácidos, em bancos de dados públicos, foi anotada para as sequências de aminoácidos deduzidas a partir da informação sobre sequências de aminoácidos da biblioteca de cDNA. As anotações forneceram informação que sugeria a função de uma proteína que pode ser expressa a partir de um gene

em particular, que dá origem a uma sequência de cDNA em particular, porém sem resultado determinante. Com base na informação sugestiva anotada, certas sequências de cDNA foram caracterizadas como aquelas que codificavam uma proteína que possivelmente estava envolvida em alguma função biológica, em células de larva alfinete de milho, que era essencial para vida ou necessária para assegurar saúde e vitalidade à célula, ou que possivelmente estaria envolvida na integridade celular, manutenção celular, capacidade reprodutora e funções semelhantes.

[00164] Sequências, selecionadas para investigação posterior, foram utilizadas para construção de moléculas de RNA de fita dupla, para incorporação em dieta de CRW. Foram criados pares de iniciadores por amplificação térmica, com base em sequências iniciais de cDNA e EST para obter sequências utilizadas em ensaios de alimentação. Pares de iniciadores foram construídos, que sob a forma de par de sequências de nucleotídeos, cada membro de um par de iniciador exibindo complementaridade perfeita, quer para uma sequência senso ou antissenso. Algumas sequências de par de iniciadores foram construídas de forma que cada membro do par exibiu uma sequência contendo um promotor T7 de RNA polimerase de fago, em sua extremidade 5'. De preferência, foi conduzida uma primeira reação de amplificação de alta fidelidade, empregando um primeiro par de iniciador sem um promotor T7 para gerar um primeiro amplicon, utilizando DNA genômico de CRW, como modelo. De preferência, é utilizada uma sequência de cDNA ou mRNA, como o modelo para a síntese de uma molécula de dsRNA a ser utilizada na presente invenção, em virtude de sequências de genoma eucariótico serem reconhecidas na técnica como contendo sequências que não estão presentes na molécula madura de RNA. Uma amostra do primeiro amplicon gerado pela primeira reação de amplificação de alta

fidelidade foi então utilizada como modelo em uma segunda reação de amplificação térmica com um segundo par de iniciador, contendo a sequência do promotor T7, para que fosse produzido um segundo amplicon que contivesse um promotor T7 em ou encaixado na extremidade 5' de cada fita do segundo amplicon. A sequência completa de nucleotídeos do segundo amplicon foi obtida, em ambas as direções, e comparada à sequência de nucleotídeos, conforme relatada para o cDNA, e as divergências entre as duas sequências, se existentes, foram anotadas. De modo geral, sequências preparadas empregando DNA genômico, como modelo, foram incompatíveis para uso posterior como moléculas de dsRNA a ser utilizado para atingir níveis significativos de supressão, em virtude de variações nas sequências de genomas que não estavam presentes na sequência do mRNA ou cDNA.

[00165] Uma reação de transcrição in vitro continha tipicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 microgramas de modelo de DNA linearizado, tampão de reação de polimerase T7, com 10X de concentração, ribonucleotídeos ATP, CTP, GTP e UTP, em concentração final de 50 a 100 mM cada, e 1 unidade da enzima RNA polimerase T7. A reação com RNA polimerase foi incubada em aproximadamente 37°C, dependendo da temperatura ótima da RNA polimerase utilizada, de acordo com as instruções do fabricante, por um período de tempo que variou de diversos minutos a diversas horas. De modo geral, as reações foram conduzidas em aproximadamente 2 horas a aproximadamente 6 horas, para transcrição de sequências de modelo com até aproximadamente 400 nucleotídeos em extensão, e por até 20 horas para transcrição de sequências de modelo com mais de 400 nucleotídeos em extensão. O aquecimento da reação para 65°C por quinze minutos finaliza a transcrição de RNA. Produtos da transcrição do RNA foram precipitados em etanol,

lavador, secados no ar e ressuspensos em água livre de RNase até concentração de aproximadamente 1 micrograma por microlitro. A maioria dos transcritos, que se aproveitou da estratégia de se opor ao promotor T7, descrita acima, produziu RNA de fita dupla na reação de transcrição *in vitro*, no entanto, um rendimento mais alto de RNA de fita dupla foi obtido pelo aquecimento do RNA purificado até 65°C e, em seguida, resfriamento lento até a temperatura ambiente para assegurar o anelamento apropriado de segmentos sentido e antissenso do RNA. O RNA de fita dupla produzido foi então incubado com DNase I e RNase a 37°C por uma hora para remover qualquer DNA ou RNA de fita simples presente na mistura. Os produtos de RNA de fita dupla foram purificados em coluna, de acordo com as instruções do fabricante (Kit de RNAi MEGAscript® da AMBION) e ressuspensos em tampão Tris-HCl a 10 mM (pH 7,5) ou água sem RNase até concentração entre 0,1 e 1,0 micrograma por microlitro.

[00166] As sequências de nucleotídeos seguintes foram derivadas primeiramente como sequências de cDNA, identificadas em biblioteca de cDNA de intestino médio de larva alfinete de milho (Andersen et al., *ibid*), e adaptadas para uso em construção de moléculas de RNA de fita dupla a serem utilizadas em testes de eficácia de inibição de função biológica em praga, pela inclusão das moléculas de RNA de fita dupla na dieta da praga.

A. Sequências homólogas de CHD3

[00167] Genes CHD foram identificados em inúmeros eucariotes, e as proteínas correspondentes são propostas para operarem como fatores re-modeladores de cromatina. O termo CHD é derivado dos três domínios com homologia de sequência, encontrados em proteínas CHD: um domínio cro-mo (modificador de organização de cromatina), um domínio de helica-se/ATPase relacionado com SNF2 e um domínio de ligação de DNA, cada qual supostamente conferindo uma atividade

distinta relacionada com cro-matina. As proteínas CHD são separadas em duas categorias, com base na presença ou ausência de outro domínio com homologia de sequência, um domínio de dedo de zinco PHD, tipicamente associado à atividade relacionada com cromatina. As proteínas relacionadas com CHD3 possuem um domínio de dedo de zinco PHD, porém as proteínas relacionadas com CHD1 não possuem. Observações experimentais sugeriram que as proteínas CHD3 participariam na repressão de transcrição e, em algumas espécies, foi demonstrado como sendo componente de um complexo que contém histona desacetilase como subunidade. A desacetilação de histonas está correlacionada à inativação transcricional e, dessa forma, proteínas CHD3 foram envolvidas para atuarem como repressoras de transcrição em virtude de fazerem parte de um complexo da histona desacetilase (Ogas et al., 1999). Portanto, a supressão da síntese de proteína CHD3 pode ser um alvo útil para inibição mediada por RNA de fita dupla de coleópteros-pragas.

B. Sequências homólogas de beta-tubulina

[00168] As proteínas tubulina são componentes estruturais importantes de muitas estruturas em todas as células de eucariotes e, principalmente, na formação de microtúbulos. A inibição da formação de microtúbulos resulta em efeitos catastróficos, incluindo interferência com a formação de fusos mitóticos, bloqueio de divisão celular e similar. Por conseguinte, a supressão da formação de proteína tubulina pode ser um alvo útil para inibição mediada por RNA de fita dupla.

C. Sequências homólogas da V-ATPase de 40 kDa

[00169] O metabolismo energético em organelas subcelulares, em sistemas eucarióticos, é uma função essencial. As ATP sintases de vacúolos estão envolvidas na manutenção de níveis suficientes de ATP em seu interior. Por conseguinte, ATP sintases de vacúolo

podem ser um alvo útil para inibição mediada por RNA de fita dupla.

D. Sequências homólogas de EF1A

[00170] Os fatores de alongamento de transcrição e de término de trans-crição são essenciais para o metabolismo e podem ser alvos vantajosos pa-ra inibição mediada por RNA de fita dupla.

E. Sequências homólogas de subunidade p28 de proteassomo 26S

[00171] O proteassomo 26S é uma protease com múltiplas subunidades dependente de ATP que está altamente preservada em todos os eucariotes. Ela possui uma função geral na remoção seletiva de várias proteínas de vida curta que são inicialmente ligadas covalentemente à ubiquitina e, em seguida, degradadas pelo complexo proteassomo 26X. A via da ubiquitina desempenha papel importante no controle do ciclo celular pela degradação específica de algumas proteínas reguladoras, incluindo ciclinas mitóticas e inibidores de cinases dependentes de ciclina, como a p27 de células de mamíferos. Portanto, a supressão da síntese de proteassomo 26S e supres-são da síntese de suas subunidades constituintes podem ser alvos de esco-lha para inibição mediada por RNA de fita dupla (Smith et al., 1997).

F. Sequências homólogas de epóxido hidrolase de hormônio juvenil

[00172] O hormônio juvenil de insetos controla e regula uma variedade de processos biológicos necessários dentro do ciclo de vida do inseto, inclu-indo, mas não necessariamente sem restrição, metamorfose, reprodução e diapausa. É necessário que as concentrações do hormônio juvenil (JH) atinjam um pico em ocasiões apropriadas, dentro da hemolinfa da forma lar-val de um inseto-praga, especialmente larvas de lepidópteros e coleópteros, e este deve ser, em seguida, degradado para finalizar os efeitos da resposta hormonal. Enzimas envolvidas na diminuição do hormônio juvenil são efe-tivas através de duas vias primárias de degradação metabólica. Uma via en-

volve a esterase do hormônio juvenil (JHE), que hidrolisa o metil éster, fornecendo o ácido correspondente. A segunda via utiliza a epóxido hidrolase do hormônio juvenil (JHEH) para levar a cabo a hidrólise do epóxido, resultando em formação do diol. A contribuição da JHE, na degradação do JH, é bem-entendida e foi constatado não variar entre as espécies lepidóptera e coleóptera. A inibição da esterase do JH foi associada a alterações morfológicas graves, incluindo, entre outras, deambulação larval, pupação atrasada e desenvolvimento de intermediários mal formados. Por outro lado, a contribuição da JHEH, no metabolismo do JH, é menos bem entendida e foi constatado que varia entre as espécies, porém estudos recentes indicam evidências que sugerem que a JHEH pode ser a via primária de metabolismo do JH (Brandon J. Fetterolf, Doctoral Dissertation, Universidade do Estado da Carolina do Norte (10 de fevereiro de 2002) Synthesis and Analysis of Mechanism Based Inhibitors of Juvenile Hormone Epoxide Hydrolase from Insect *Trichoplusia ni*). De qualquer modo, a desorganização de qualquer via de degradação do JH, empregando tecnologia de supressão gênica, poderia ser um alvo efetivo para inibição mediada por RNA de fita dupla.

G. Sequências homólogas da proteína do canal de cloreto, dependente de inchamento

[00173] Foi postulado que proteínas do canal de cloreto, dependentes de inchamento, desempenhariam um papel fundamental em regulação osmótica de sistemas celulares de animais. Por conseguinte, uma sequência de nucleotídeos que exiba a capacidade de expressar uma sequência de aminoácidos que tenha homologia a proteínas do canal de cloreto, dependente de inchamento, poderiam ser um alvo útil para inibição por RNA em uma praga.

H. Sequências homólogas da proteína glicose-6-fosfato-1-desidrogenase

[00174] A proteína glicose-6-fosfato-1-desidrogenase (G6PD) cataliza a oxidação da glicose-6-fosfato para 6-fosfogluconato, ao mesmo tempo em que reduz a forma oxidativa do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺) para NADPH. O NADPH é conhecido na técnica como co-fator exigido em muitas reações biossintéticas eucarióticas, e é conhecido por manter a glutatona em sua forma reduzida. A glutatona reduzida atua co-mo seqüestrante de metabólito oxidativos perigosos em células de eucariotes, e com a assistência da enzima glutatona peroxidase, converte o nocivo peróxido de hidrogênio em água (Beutler et al., 1991). Portanto, o G6PD pode ser um alvo preferível para inibição mediada por RNA de fita dupla em coleótero-praga.

I. Sequências homólogas da proteína ACT42A

[00175] A actina é uma proteína eucariótica generalizada e altamente conservada, necessária para motilidade celular e locomoção (Lovato et al., 2001). Algumas sequências identificadas de cDNA do CRW supostamente poderiam codificar actina ou proteínas com estrutura de sequências de aminoácidos relacionadas a proteínas actina. Por conseguinte, genes que codificam homólogos da actina, em uma célula de praga, podem ser alvos úteis para inibição mediada por RNA de fita dupla.

J. Sequências homólogas do fator 1 de ADP-ribosilação

[00176] Foi demonstrado que fatores de ADP-ribosilação eram fundamentais para o funcionamento celular, visto desempenharem o papel integral nos processos de reparo de dano a DNA, carcinogênese, morte celular e estabilidade genômica. Por conseguinte, seria útil ser capaz de desorganizar seletivamente a transcrição de fatores de ADP-ribosilação em espécies de coleótero-praga, empregando inibição mediada por RNA de fita dupla.

K. Sequências homólogas da proteína do fator IIB de transcrição

[00177] Fatores de alongamento de transcrição e de término de transcrição, conforme indicado acima, são essenciais para o metabolismo e podem ser alvos vantajosos para inibição mediada por RNA de fita dupla para controle ou eliminação de infestação por coleóptero-praga.

L. Sequências homólogas de quitinase

[00178] A quitina é um $\beta(1 \rightarrow 4)$ homopolímero da N-acetilglucosamina e é encontrada em exoesqueletos de insetos. A quitina é formada a partir da UDP-N-acetilglucosamina, em uma reação catalizada pela quitina sintase. A quitina é um polissacarídeo estrutural homopolímero, e há muitas etapas enzimáticas envolvidas na construção desta estrutura altamente ramificada e com ligações cruzadas. A quitina confere forma, rigidez e suporte a insetos, criando um arcabouço, ao qual, órgãos internos, como músculos, são presos. A quitina precisa também ser degradada, em alguma medida, para mediar as etapas envolvidas no processo de troca de proteção externa de insetos. Por conseguinte, acredita-se que a inibição, mediada por RNA de fita dupla, de proteínas nessas vias seria útil como meio para controle de infestação por coleóptero-praga.

M. Sequências homólogas da enzima que conjuga a ubiquitina

[00179] A via da ubiquitina desempenha papel importante no controle do ciclo celular pela degradação específica de algumas proteínas reguladoras, incluindo ciclinas mitóticas e inibidores de cinases dependentes de ciclina, como a p27 de células de mamíferos. Dessa forma, genes, codificadores de ubiquitina e de componentes associados, podem ser um alvo de escolha para inibição mediada por RNA de fita dupla. (Smith et al., 1997). A via proteolítica dependente de ubiquitina é uma das vias mais importantes pelas quais proteínas intracelulares são destruídas seletivamente em eucariotes. A conjugação da ubiquitina a substratos protéicos é mediada por um

arranjo notadamente diverso de enzimas. O alvo proteolítico pode ser regulado também em etapas entre a ubiquitinação do substrato e sua de-gradação para peptídeos pela protease 26S de múltiplas subunidades. A complexidade do sistema da ubiquitina sugere um papel central para turno-ver (utilização) protéico na regulação de células de eucariotes, e envolve outras proteínas na via, incluindo a enzima que ativa a ubiquitina, enzima de conjugação de ubiquitina, ubiquitina proteína ligase e componentes de subunidades do proteassomo 26S. Por conseguinte, acredita-se que a inibição de proteínas, mediada por RNA de fita dupla, nesta via seria útil como meio para controle de infestação por coleóptero-praga.

N. Sequências homólogas da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

[00180] A via glicolítica é essencial na maioria dos organismos e está envolvida na produção de energia metabólica, resultante da degradação de glicose. Uma enzima importante no segundo estágio da via glicolítica é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), a qual, na presença de NAD⁺ e fosfato inorgânico, cataliza a oxidação do 3-fosfo-gliceraldeído para 3-fosfoglicerol-fosfato, acompanhado de formação de NADH. O componente importante dessa reação é o armazenamento de energia, através da formação de NADH. Genes que codificam enzimas associadas à via glicolítica e, especialmente, genes que codificam enzimas envolvidas nas etapas úteis na formação de reservas de energia podem ser alvos especialmente úteis para inibição mediada por RNA de fita dupla em espécies de coleóptero-praga.

O. Sequências homólogas de ubiquitina B

[00181] Conforme foi descrito acima, a via de degradação da proteína ubiquitina desempenha papel importante no controle do ciclo celular pela degradação específica de algumas proteínas reguladoras, incluindo ciclinas mitóticas e inibidores de cinases dependentes de

ciclina, como a p27 de células de mamíferos. Dessa forma, genes, que codificam ubiquitina e componentes associados, podem ser um alvo de escolha para inibição mediada por RNA de fita dupla (Smith et al., 1997).

P. Homólogos de esterase de hormônio juvenil

[00182] Conforme foi indicado acima, o hormônio juvenil de insetos controla e regula uma variedade de processos biológicos necessários no ciclo de vida do inseto, incluindo, mas sem necessariamente restrição, metamorfose, reprodução e diapausa. A desorganização da síntese de JH ou de vias de degradação, empregando a tecnologia de supressão gênica, poderia ser um alvo efetivo para inibição mediada por RNA de fita dupla de pragas.

Q. Sequências homólogas da alfa tubulina

[00183] Células eucarióticas utilizam geralmente elementos estruturais citoesqueléticos, importantes não só como arcabouço mecânico, mas também para sustentar o formato da célula. Microfilamentos semiflexíveis tornam as células móveis, ajuda na divisão mitótica (citocinese) e, em animais vertebrados e invertebrados, além de serem responsáveis por contração muscular. Os microtúbulos relativamente rígidos, feitos de proteínas alfa e beta tubulina, desempenham papel importante, atuando como uma espécie de auto-estrada para transporte de vesículas e organelas e na separação de cromossomos durante mitose (cariocinese). Os filamentos intermediários flexíveis conferem, no mínimo, força adicional para toda a estrutura celular. O citoesqueleto é também conhecido como estando envolvido em sinalização através do citoplasma celular. Levando em consideração estas funções, acredita-se que qualquer desorganização do citoesqueleto, ou até mesmo alterações sutis de sua integridade, pode causar consequências patológicas a uma célula.

R. Sequências relacionadas a transporte

[00184] Conforme foi indicado acima, a seleção e transporte de várias moléculas em uma célula, incluindo para organelas apropriadas, bem como sua secreção, são funções fisiológicas importantes. Essas vias de seleção poderiam incluir aquelas em que se baseia o complexo de seleção endos-sômico endossômico, exigidas para transporte (ESCRT), complexos I-III, entre outros. Dessa forma, funções relacionadas a transporte de polipeptídeos e de outras moléculas podem também ser um alvo de escolha para inibição mediada por dsRNA.

Exemplo 2

Bioensaios de alimentação de insetos

[00185] Amostras de RNA de fita dupla RNA (dsRNA) foram submetidas a bioensaio com um número selecionado de pragas-alvo. O dsRNA foi preparado a partir de sequências identificadas de acordo com o Exemplo 1, empregando uma sequência contig completa, no caso de SEQ ID Nos: 1-6, ou sequência amplificada a partir da contig montada, empregando os pa-res de iniciador, conforme indicados na listagem de sequências. Foram aplicadas variações do dsRNA, sob a forma de revestimento para dieta artificial de larva alfinete de milho, de acordo com o seguinte procedimento. Foram obtidos ovos de *Diabrotica virgifera virgifera* (WCR), fornecidos pela Crop Characteristics, Inc., Farmington, Minnesota. Os ovos de WCR que não estavam em diapausa foram incubados no solo por aproximadamente 13 dias a 24°C, 60% de umidade relativa, em completa escuridão. No 13º dia, o solo contendo os ovos de WCR foi colocado em peneiras entre 30 e 60 mesh, sendo os ovos lavados e separados do solo, empregando uma mangueira de jardim de alta pressão. A superfície dos ovos foi desinfetada por imersão em LYSOL por três minutos, lavada três vezes com água estéril, uma vez com

solução de formalina a 10% e, em seguida, lavada novamente mais três vezes com água estéril. Os ovos tratados dessa maneira foram dis-pensados em filtros de café estéreis e incubados, durante a noite, a 27°C, 60% de umidade relativa, em completa escuridão.

[00186] Para preparar o dsRNA, amplicons de sequências selecionadas foram clonados em vetor plasmídeo capaz de se replicar em *E. coli*, tendo sido recuperadas quantidades suficientes de DNA do plasmídeo para permi-tir a transcrição in vitro de RNA polimerase T7, provenientes dos promotores T7, encaixados de modo convergente em qualquer extremidade do fragmen-to clonado. RNA de fita dupla foi produzido e submetido a bioensaio; um segmento de RNA compreendendo a sequência, conforme indicada na listagem de sequências, o outro segmento de RNA sendo substancialmente o complemento reverso da sequência de nucleotídeos, uridinas apropria-damente posicionadas no lugar de timidinas. Uma amostra do RNA de fila-mento (dsRNA) foi tratada com DICER ou com RNase III para produzir quantidades suficientes de pequeno RNA interferente RNA (siRNA). Amos-tras contendo siRNA ou dsRNA foram sobrepostas na dieta do CRW do bio-ensaio, conforme descrito acima, e foi permitido que as larvas se alimentas-sem, conforme abaixo.

[00187] Uma amostra de RNA de fita dupla foi acrescentada dire-tamente a cada cavidade contendo dieta do inseto, conforme indicado aci-ma, ou foi modificada antes de ser acrescentada à dieta. A modificação de RNA de fita dupla seguiu as instruções para RNase III (AMBION CORPORATION, Austin, Texas) ou DICER (STRATAGENE, La Jolla, Cali-fornia), fornecidas pelo fabricante. A digestão, pela RNase III, do RNA de fita dupla produziu vinte e um e vinte e dois dúplex de nucleotídeos, contendo extremidades 5' fosforiladas e extremidades 3' hidroxiladas, com ressaltos de 2-3 bases, semelhantes aos fragmentos de RNA pequeno inter-ferente com

dúplex de ~21-26 pares de base (siRNA), produzidos pela enzima Dicer na via eucariótica, identificada por Hamilton et. al. (1999) e El-bashir et. al. (2001a). Essa coleção de dúplex de RNA curto interferente foi ainda purificada e uma amostra caracterizada por eletroforese em gel de poliacrilamida para determinar a integridade e eficiência da formação de dúplex. A pureza e quantidade da amostra foram, então, determinadas por espectrofotometria, em comprimento de onda de 250 nanômetros, e a amostra não utilizada foi retida, para uso posterior, em armazenamento a -20°C .

[00188] A dieta do inseto foi preparada essencialmente de acordo com Pleau et al. (2002), com as seguintes modificações: 9,4 gramas de ágar SERVA foram dispensados em 540 mililitros de água purificada e agitados até que o ágar fosse inteiramente distribuído. A mistura água/Ágar foi aquecida até ferver para dissolução completa do Ágar e, em seguida, despejada em um misturador WARING. O misturador foi mantido em baixa velocidade, enquanto que 62,7 gramas da mistura BIO-SERV DIET (F9757), 3,75 gramas de raiz de milho liofilizado, 1,25 mililitro de corante verde de comida e 0,6 mililitros de formalina foram acrescentados à mistura quente de ágar. O pH da mistura foi, então, ajustado para 9,0, com o acréscimo de solução de estoque de hidróxido de potássio a 10%. Os 600 mililitros aproximados de volume da dieta líquida foram misturados continuamente em alta velocidade e mantidos em aproximadamente 48°C a aproximadamente 60°C , empregando uma barra esterilizada de agitação com revestimento magnético NALGE-NE em prato magnético quente de agitação, enquanto dispensados em alíquotas de 200 microlitros em cada cavidade das placas de microtitulação de 96 cavidades de fundo redondo FALCON. Foi permitido que a dieta nas placas solidificasse e secasse no ar, em capela biológica, por aproximadamente dez minutos.

[00189] Volumes de trinta (30) microlitros de amostras em teste, contendo reagentes de controle ou RNA de fita dupla, em quantidades variadas foram sobrepostos à superfície da dieta do inseto em cada cavidade, utilizando um repetidor de micropipetagem. A dieta foi deixada na capela biológica estéril por mais de meia hora depois de ser feita a aplicação das amostras em testes, permitindo a difusão de reagentes na dieta e para que a superfície da dieta secasse. Uma larva neonata de WCR foi colocada em cada cavidade com um pincel fino. As placas foram vedadas com MYLAR e ventiladas utilizando um grampo de inseto. Foram testadas de 12-72 larvas de inseto por dose, dependendo no desenho do ensaio. As placas de bio-ensaio foram incubadas a 27°C, 60% de umidade relativa e em completa escuridão por 12-14 dias. O número de larvas sobreviventes por dose foi registrado no timepoint de 12-14 dias. A massa larval foi determinada, utilizando microbalança para cada larva sobrevivente. Os dados foram analisados, utilizando o software estatístico JMP®4 (SAS Institute, 1995), e uma análise fatorial completa por ANOVA foi conduzida com teste de Dunnett para detecção de efeitos do tratamento, comparados ao controle não tratado ($P < 0,05$). Foi efetuado teste de Tukey-Kramer post hoc para comparar todos os pares dos tratamentos ($P < 0,05$). Os resultados dos ensaios de alimentação de larvas de CRW exibiram inibição significativa de crescimento e mortalidade, comparado a controles, conforme explicado abaixo.

Exemplo 3

Resultados de Bioensaios de Alimentação de Insetos

[00190] Foi preparada dieta artificial suficiente para cultivar larvas alfinete de milho foi preparada, aplicando-se amostras de sequências de RNA de fita dupla, identificadas conforme descrito no Exemplo 1, empregando bioensaios, conduzidos conforme descrito no Exemplo 2. Foi permitido que as larvas alfinete de milho artificial se alimentassem

da dieta por doze dias, e a mortalidade e atrofia foi monitorada em comparação a larvas alfinete de milho que se alimentaram somente de dietas de controle negativo e positivo. Os resultados dos estudos confirmaram níveis significativos ($p < 0,05$) de atrofia e/ou mortalidade larval, utilizando dsRNAs contendo partes de se-qüências homólogas de uma variedade de classes diferentes de genes. As sequências e vetores com rendimento significativo de atrofia e/ou mortalidade e as SEQ ID NO, correspondentes à sequência expressada como dsRNA, são fornecidas nas Tabelas 1-5 abaixo.

Tabela 1:

Constructos de dsRNA que demonstram efeito significativo de atrofia e/ou mortalidade em Bioensaios de Alimentação de Inseto com larva alfinete do milho do Sul ou larva alfinete do milho ocidental

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
RNAi-pIC17553: 001	Maçã	697
RNAi-pIC17504: 049	Toda extensão de EST de V-ATPase	695
RNAi-pIC17554: 001	Rpl 9	698
RNAi-pIC17555: 001	Rpl 19	699
RNAi-pIC17504: 050	Seção 6.0 de V-ATPase	711
RNAi-pIC19514: 001	mRNA de enzima de revestimento de WCR LIB5496-028-A1-M1-A7	696
RNAi-pIC17552: 003	LIB5462-042-A1-M1-H10 Dv.6_CG9355 DUSKY Constituinte estrutural de cutícula	700
RNAi-pIC17546: 003	LIB5462-091-A1-M1-G3 Dv.1_CG6217 KNICKKOPF Desc.	701
RNAi-pIC17546: 001	Dv.1_CG6217	1
RNAi-pIC17549: 001	Dv.4_CG1435	4
RNAi-pIC17550: 001	LIB5444-065-A1-M1-D5 Dv.5_cg1915_1	5
RNAi-pIC17551: 001	LIB5462-012-A1-M2-B2 Dv.5_cg1915_2	703

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
RNAi-pIC17552: 001	Dv.6_CG9355	6
RNAi-pMON78412: 002	Dv.7_CG3416; suposto ortólogo Mov34: CG3416	10
RNAi-pMON96172: 002	Dv.8_CG1088; suposta subunidade E de H+ATPase vacuolar: ortólogo de CG1088	14
RNAi-pMON96168: 002	Dv.9_CG2331; suposta atividade de ATPase: ortólogo de CG2331	18
RNAi-pMON78424: 002	Dv.10_CG6141; suposta proteína L9 ribossômica: ortólogo de CG6141	22
RNAi-pMON78425: 001	Dv.11_CG2746	26
RNAi-pMON78444: 002	Dv.12_CG1341; suposta partícula reguladora de proteassomo, rpt1: ortólogo de CG1341	30
RNAi-pMON78416: 002	Dv.13_CG11276; suposta proteína ribossômica S4: ortólogo de CG11276	34
RNAi-pMON78434: 001	Dv.14_CG17927_2; suposta cadeia pesada de miosina: ortólogo de CG17927	38
RNAi-pMON78439: 001	Dv.16_CG5394; suposta glutamil- prolil-tRNA sintetase: ortólogo de CG5394	46
RNAi-pMON78438: 001	Dv.17_CG10149; suposta subunidade p44.5 de proteassomo rpn6: ortólogo de CG10149	50
RNAi-pMON78435: 002	Dv.18_CG1404; suposta GTPase de RAN pequena monomérica: ortólogo de CG1404	54
RNAi-pMON78449: 002	Dv.19_CG18174; suposta partícula reguladora de proteassomo, subcomplexo lid, rpn11: ortólogo de CG18174	58
RNAi-pMON78419: 001	Dv.20_CG3180_1; suposta RNA polimerase II, direcionada por DNA: ortólogo de CG3180	62

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
RNAi-pMON78440: 002	Dv20_CG3180_2; suposta RNA polimerase II, direcionada por DNA: ortólogo de CG3180	706
RNAi-pMON78420: 001	Dv.21_CG3320; suposto Rab1: ortólogo de CG3320	70
RNAi-pMON78410: 002	Dv.22_CG3395; suposta proteína S9 ribossômica: ortólogo de CG3395	74
RNAi-pMON78422: 001	Dv.23_CG7269; suposta helicase: ortólogo de CG7269	78
RNAi-pMON78423: 001	Dv.25_CG9012; suposta cadeia pesada de clatrina: ortólogo de CG9012	86
RNAi-pMON78414: 006	DV.26 sec1 ~ 5' metade de EST	710
RNAi-pMON78414: 001	Dv.26_CG9261; suposta ATPase de troca de sódio/potássio: ortólogo de CG9261	90
RNAi-pMON78413: 001	Dv.27_CG12052; suposto fator de transcrição de RNA polimerase II: ortólogo de CG12052	94
RNAi-pMON78427: 001	Dv.35_CG3762; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762	126
RNAi-pMON97122: 001	C1_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero	713
RNAi-pMON97127: 001	C2_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero	714
RNAi-pMON97125: 001	C3_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero	715
RNAi-pMON78441: 001	Dv.39_CG9078; suposta esfingolípido delta-4 dessaturase; esteroil-CoA 9-dessaturase: ortólogo de CG9078	142
RNAi-pMON97114: 001	Dv.41_CG2637; fêmea estéril Ketel; envolvido em importação de proteína-núcleo: ortólogo de CG2637	150

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
RNAi-pMON97140: 001	Dv.44_CG1244; suposta atividade de ligação de ácido nucléico: ortólogo de CG1244	162
RNAi-pMON78429: 001	Dv.46_CG10689; suposta RNA helicase: ortólogo de CG10689	170
RNAi-pMON78432: 001	Dv.48_CG33196; suposta proteína tirosina cinase de receptor de membrana: ortólogo de CG33196	178
RNAi-pMON78428: 001	Dv.49_CG8055_1; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055_1	182
RNAi-pMON78428: 003	Dv.49_CG8055_1; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055_1, sem região selecionada de DV.49	704
RNAi-pMON78426: 001	Dv.50_CG10110_1; suposto fator de especificidade de clivagem e poliadenilação: ortólogo de CG10110_1	186
RNAi-pMON96185: 001	Dv.55_CG5931; suposta atividade de fator de união, atividade de RNA helicase: ortólogo de CG5931	202
RNAi-pMON78442: 001	Dv.57_CG2968; suposta ATPase exportadora de hidrogênio: ortólogo de CG2968	206
RNAi-pMON78431: 001	Dv.58_CG1751; suposta peptidase de sinalização: ortólogo de CG1751	210
RNAi-pMON96177: 001	Dv.61_CG3725_1; suposta ATPase de cálcio: ortólogo de CG3725	222
RNAi-pMON96183: 001	Dv.62_CG3612; suposto líder: ortólogo de CG3612	230
RNAi-pMON96180: 002	Dv.65_CG7033; suposta atividade de acompanhante: ortólogo de CG7033	242

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
RNAi-pMON96176: 001	Dv.66_CG32019; suposta curvatura: ortólogo de CG32019	246
RNAi-pMON96170: 002	Dv.67_CG16916; suposta atividade de endopeptidase: ortólogo de CG16916	250
RNAi-pMON96166: 001	Dv.70_CG5771; suposta proteína Rab 11: ortólogo de CG5771	258
RNAi-pMON96179: 001	Dv.72_CG6831; suposto rhea: ortólogo de CG6831	266
RNAi-pMON96186: 001	Dv.73_CG10119; suposta Lamina C: ortólogo de CG10119	270
RNAi-pMON96160: 002	Dv.74_CG6375; suposto <i>pitchoune</i> : ortólogo de CG6375	274
RNAi-pMON97137: 001	Dv.77_CG4214; suposta sintaxina 5; envolvida em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG4214	286
RNAi-pMON96167: 001	Dv.82_CG8264; suposto Bx42: ortólogo de CG8264	302
RNAi-pMON96171: 001	Dv.83_CG11397; suposto gluon: ortólogo de CG11397	306
RNAi-pMON96187: 003	Dv.85_CG4494; suposta atividade de ligação protéica: ortólogo de CG4494	314
RNAi-pMON96174: 001	Dv.86_CG5055; suposto bazooka: ortólogo de CG5055	318
RNAi-pMON97126: 001	Dv.88_CG8756; função desconhecida; contém domínio de ligação de quitina: ortólogo de CG8756	326
RNAi-pMON97130: 001	Dv.93_CG8515; suposto constituinte estrutural de cutícula; contém domínio de ligação de quitina: ortólogo de CG8515	342
RNAi-pMON97109: 001	Dv.99_CG2446; desconhecido; letal em <i>Drosophila</i> e baixa homologia com seres humanos: ortólogo de CG2446	366

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
RNAi-pMON97111: 001	Dv.105_CG1250_1; ativador de GTPase, envolvido em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG1250	390
RNAi-pMON97112: 001	Dv.105_CG1250_2; ativador de GTPase, envolvido em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG1250	394
RNAi-pMON97107: 001	Dv.107_CG14813; revestimento de vesícula COPI; envolvido em Golgi para transporte protéico intracelular RE: ortólogo de CG14813	398
RNAi-pMON97115: 001	Dv.108_CG17248; n-sinaptobrevina; envolvido em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG17248	402
RNAi-pMON97133: 001	Dv.113; função desconhecida; sequência exclusiva de WCR	422
RNAi-pMON97121: 001	Dv.122_CG3164; suposta atividade de veículo de cartucho de ligação com ATP: ortólogo de CG3164	454
RNAi-pMON97134: 001	Dv.127; função desconhecida, sem homologia com seres humanos	470
RNAi-pMON97171: 001	Dv.146; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	514
RNAi-pMON97166: 001	Dv.147; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	518
RNAi-pMON97167: 001	Dv.149; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	526
RNAi-pMON97169: 001	Dv.155; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	550
RNAi-pMON97173: 001	Dv.162; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	578
RNAi-pMON97170: 001	Dv.170; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	610

Tabela 2:

Constructos de dsRNA causadoras de níveis significativos de atrofia em Bioensaios de Alimentação com larvas de larva alfinete do milho ocidental (WCR).

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pIC17553: 001	Maçã
RNAi-pIC17504: 049	Extensão completa de EST de V-ATPase
RNAi-pIC17554: 001	Rpl 9
RNAi-pIC17555: 001	Rpl 19
RNAi-pIC17504: 050	Seção 6.0 de V-ATPase
RNAi-pIC16005: 001	Subunidade 1 de V-ATPase D
RNAi-pIC19514: 001	mRNA de enzima de revestimento de WCR mRNA LIB5496-028-A1-M1-A7
RNAi-pIC17546: 001	Dv.1_CG6217
RNAi-pIC17549: 001	Dv.4_CG1435
RNAi-pIC17551: 001	LIB5462-012-A1-M2-B2 Dv.5_cg1915_2
RNAi-pIC17552: 001	Dv.6_CG9355
RNAi-pMON78412: 001	Dv.7_CG3416
RNAi-pMON78412: 002	Dv.7_CG3416; suposto Mov34: ortólogo de CG3416
RNAi-pMON96172: 002	Dv.8_CG1088; suposta subunidade E de H ⁺ ATPase vacuolar: ortólogo de CG1088
RNAi-pMON96168: 002	Dv.9_CG2331; suposta atividade de ATPase: ortólogo de CG2331
RNAi-pMON78424: 002	Dv.10_CG6141; suposta proteína L9 ribossômica: ortólogo de CG6141
RNAi-pMON78425: 001	Dv.11_CG2746
RNAi-pMON78444: 002	Dv.12_CG1341; suposta partícula reguladora de proteassomo, rpt1: ortólogo de CG1341
RNAi-pMON78416: 002	Dv.13_CG11276; suposta proteína S4 ribossômica: ortólogo de CG11276
RNAi-pMON78434: 001	Dv.14_CG17927_2; suposta cadeia pesa de miosina: ortólogo de CG17927

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON78439: 001	Dv.16_CG5394; suposta glutamil-prolil-tRNA sintetase: ortólogo de CG5394
RNAi-pMON78435: 002	Dv.18_CG1404; suposta GTPase de RAN pequeno monomérico: ortólogo de CG1404
RNAi-pMON78449: 002	Dv.19_CG18174; suposta partícula reguladora de proteassomo; subcomplexo lid, rpn11: ortólogo de CG18174
RNAi-pMON78440: 002	Dv.20_CG3180_2; suposta RNA polimerase II orientada por DNA: ortólogo de CG3180
RNAi-pMON78420: 002	Dv.21_CG3320; suposto Rab1: ortólogo de CG3320
RNAi-pMON78410: 001	Dv.22_CG3395; suposta proteína S9 ribossômica: ortólogo de CG3395
RNAi-pMON78422: 001	Dv.23_CG7269; suposta helicase: ortólogo de CG7269
RNAi-pMON78423: 001	Dv.25_CG9012; suposta cadeia pesada de clatrina: ortólogo de CG9012
RNAi-pMON78414: 001	Dv.26_CG9261; suposta ATPase de troca sódio/potássio: ortólogo de CG9261
RNAi-pMON78413: 001	Dv.27_CG12052; suposto fator de transcrição de RNA polimerase II: ortólogo de CG12052
RNAi-pMON97122: 001	C1_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762, concatâmero
RNAi-pMON97127: 001	C2_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero
RNAi-pMON97125: 001	C3_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero
RNAi-pMON78427: 007	Dv.35_CG3762; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762
RNAi-pMON78441: 001	Dv.39_CG9078; suposta esfingolipídeo delta-4 dessaturase; esteroil-coa 9-dessaturase: ortólogo de CG9078
RNAi-pMON97114: 001	Dv.41_CG2637; Fêmea estéril Ketel; envolvida em importação proteína-núcleo: ortólogo de CG2637

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON78429: 001	Dv.46_CG10689; suposta RNA helicase: ortólogo de CG10689
RNAi-pMON78432: 001	Dv.48_CG33196; suposta proteína tirosina cinase de receptor de membrana: ortólogo de CG33196
RNAi-pMON78428: 001	Dv.49_CG8055_1; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055_1
RNAi-pMON78428: 003	Dv.49_CG8055_1; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055_1, sem região selecionada de DV.49
RNAi-pMON78426: 001	Dv.50_CG10110_1; suposto fator de especificidade de clivagem e poliadenilação: ortólogo de CG10110_1
RNAi-pMON96185: 001	Dv.55_CG5931; suposta atividade de fator de união, atividade de RNA helicase: ortólogo de CG5931
RNAi-pMON78442: 001	Dv.57_CG2968; suposta ATPase de exportação de hidrogênio: ortólogo de CG2968
RNAi-pMON78431: 001	Dv.58_CG1751; suposta peptidase de sinalização: ortólogo de CG1751
RNAi-pMON96177: 001	Dv.61_CG3725_1; suposta ATPase de cálcio: ortólogo de CG3725
RNAi-pMON96182: 001	Dv.61_CG3725_2; suposta ATPase de cálcio: ortólogo de CG3725
RNAi-pMON96183: 001	Dv.62_CG3612; suposto líder: ortólogo de CG3612
RNAi-pMON96180: 002	Dv.65_CG7033; suposta atividade de acompanhante: ortólogo de CG7033
RNAi-pMON96180: 001	Dv.65_CG7033; suposta atividade de acompanhante: ortólogo de CG7033
RNAi-pMON96176: 001	Dv.66_CG32019; suposta curvatura: ortólogo de CG32019
RNAi-pMON96170: 002	Dv.67_CG16916; suposta atividade de endopeptidase: ortólogo de CG16916
RNAi-pMON96166: 001	Dv.70_CG5771; suposta proteína Rab 11: ortólogo de CG5771

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON96179: 001	Dv.72_CG6831; suposto rhea: ortólogo de CG6831
RNAi-pMON96186: 001	Dv.73_CG10119; suposta Lamina C: ortólogo de CG10119
RNAi-pMON96160: 002	Dv.74_CG6375; suposto <i>pitchoune</i> : ortólogo de CG6375
RNAi-pMON96160: 001	Dv.74_CG6375; suposto <i>pitchoune</i> : ortólogo de CG6375
RNAi-pMON97137: 002	Dv.77_CG4214; suposta syntaxina 5; envolvida em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG4214
RNAi-pMON96167: 001	Dv.82_CG8264; suposto Bx42: ortólogo de CG8264
RNAi-pMON96171: 001	Dv.83_CG11397; suposto gluon: ortólogo de CG11397
RNAi-pMON96187: 003	Dv.85_CG4494; suposta atividade de ligação de proteína: ortólogo de CG4494
RNAi-pMON97126: 001	Dv.88_CG8756; função desconhecida; contém domínio de ligação de quitina: ortólogo de CG8756
RNAi-pMON97109: 001	Dv.99_CG2446; desconhecido; letal em <i>Drosophila</i> e baixa homologia com seres humanos: ortólogo de CG2446
RNAi-pMON97111: 001	Dv.105_CG1250_1; ativador de GTPase; envolvido em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG1250
RNAi-pMON97107: 001	Dv.107_CG14813; revestimento de vesícula COPI; envolvido em transporte protéico intracelular de Golgi para RE: ortólogo de CG14813
RNAi-pMON97115: 001	Dv.108_CG17248; n-sinaptobrevina; envolvida em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG17248
RNAi-pMON97121: 001	Dv.122_CG3164; suposta atividade de veículo de cartucho de ligação de ATP: ortólogo de CG3164

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON97171: 001	Dv.146; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR
RNAi-pMON97166: 001	Dv.147; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR
RNAi-pMON97167: 001	Dv.149; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR
RNAi-pMON97169: 001	Dv.155; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR
RNAi-pMON97173: 001	Dv.162; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR
RNAi-pMON97170: 001	Dv.170; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR

Tabela 3:

Constructos de dsRNA causadoras de níveis significativos de mortalidade em Bioensaios de Alimentação com larvas de larva alfinete domilho ocidental (WCR).

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pIC17553: 001	Maçã
RNAi-pIC17504: 049	Extensão completa de EST de V-ATPase
RNAi-pIC17555: 001	Rpl 19
RNAi-pIC17554: 001	Rpl 9
RNAi-pIC17504: 050	Seção 6.0 de V-ATPase
RNAi-pIC17504: 054	Sequência de subunidade 2 de V-ATPase de <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> , toda extensão da sequência EST servindo como controle positivo
RNAi-pIC19514: 001	mRNA de enzima de revestimento de WCR LIB5496-028-A1-M1-A7
RNAi-pIC17546: 001	Dv.1_CG6217
RNAi-pIC17549: 001	Dv.4_CG1435
RNAi-pIC17550: 001	LIB5444-065-A1-M1-D5 Dv.5_cg1915_1
RNAi-pMON78412: 002	Dv.7_CG3416; suposto Mov34: ortólogo de CG3416

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON96172: 001	Dv.8_CG1088; suposta subunidade E de H+ATPase vacuolar: ortólogo de CG1088
RNAi-pMON96168: 001	Dv.9_CG2331; suposta atividade de ATPase: ortólogo de CG2331
RNAi-pMON78424: 002	Dv.10_CG6141; suposta proteína L9 ribossômica: ortólogo de CG6141g
RNAi-pMON78425: 001	Dv.11_CG2746
RNAi-pMON78444: 001	Dv.12_CG1341; suposta partícula reguladora de proteassomo, rpt1: ortólogo de CG1341
RNAi-pMON78416: 002	Dv.13_CG11276; suposta proteína S4 ribossômica: ortólogo de CG11276
RNAi-pMON78434: 001	Dv.14_CG17927_2; suposta cadeia pesada de miosina: ortólogo de CG17927
RNAi-pMON78435: 001	Dv.18_CG1404; suposta GTPase de RAN pequeno monomérico: ortólogo de CG1404
RNAi-pMON78449: 001	Dv.19_CG18174; suposta partícula reguladora de proteassomo, subcomplexo lid, rpn11: ortólogo de CG18174
RNAi-pMON78440: 001	Dv.20_CG3180; suposta RNA polimerase II orientada por DNA: ortólogo de CG3180
RNAi-pMON78420: 001	Dv.21_CG3320; suposto Rab1: ortólogo de CG3320
RNAi-pMON78410: 001	Dv.22_CG3395; suposta proteína S9 ribossômica: ortólogo de CG3395
RNAi-pMON78422: 001	Dv.23_CG7269; suposta helicase: ortólogo de CG7269
RNAi-pMON78414: 006	DV.26 sec1 ~ 5' metade de EST
RNAi-pMON78414: 001	Dv.26_CG9261; suposta ATPase de troca sódio/potássio: ortólogo de CG9261
RNAi-pMON97122: 001	C1_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero
RNAi-pMON97127: 001	C2_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero
RNAi-pMON97125: 001	C3_Dv.35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON78427: 001	Dv.35_CG3762; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762
RNAi-pMON97114: 001	Dv.41_CG2637; Fêmea estéril Ketel; envolvido em importação proteína-núcleo: ortólogo de CG2637
RNAi-pMON97140: 001	Dv.44_CG1244; Suposta atividade de ligação de ácido nucléico: ortólogo de CG1244
RNAi-pMON78429: 001	Dv.46_CG10689; suposta RNA helicase: ortólogo de CG10689
RNAi-pMON78428: 001	Dv.49_CG8055_1; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055_1
RNAi-pMON78428: 003	Dv.49_CG8055_1; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055_1, sem região selecionada de DV.49
RNAi-pMON78426: 001	Dv.50_CG10110_1; suposto fator de especificidade de clivagem e poliadenilação: ortólogo de CG10110_1
RNAi-pMON96185: 001	Dv.55_CG5931; suposta atividade de fator de união, atividade de RNA helicase: ortólogo de CG5931
RNAi-pMON78431: 001	Dv.58_CG1751; suposta peptidase de sinalização: ortólogo de CG1751
RNAi-pMON96177: 001	Dv.61_CG3725_1; suposta ATPase de cálcio: ortólogo de CG3725
RNAi-pMON96182: 001	Dv.61_CG3725_2; suposta ATPase de cálcio: ortólogo de CG3725
RNAi-pMON96180: 001	Dv.65_CG7033; suposta atividade de acompanhante: ortólogo de CG7033
RNAi-pMON96176: 001	Dv.66_CG32019; suposta curvatura: ortólogo de CG32019
RNAi-pMON96170: 001	Dv.67_CG16916; suposta atividade de endopeptidase: ortólogo de CG16916
RNAi-pMON96166: 001	Dv.70_CG5771; suposta proteína Rab 11: ortólogo de CG5771
RNAi-pMON96160: 001	Dv.74_CG6375; suposto pitchoune: ortólogo de CG6375

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON97137: 001	Dv.77_CG4214; suposta sintaxina 5; envolvida em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG4214
RNAi-pMON96167: 001	Dv.82_CG8264; suposto Bx42: ortólogo de CG8264
RNAi-pMON96187: 002	Dv.85_CG4494; suposta atividade de proteína de ligação: ortólogo de CG4494
RNAi-pMON97126: 001	Dv.88_CG8756; função desconhecida; contém domínio de ligação de quitina: ortólogo de CG8756
RNAi-pMON97130: 001	Dv.93_CG8515; suposto constituinte estrutural de cutícula; contém domínio de ligação de quitina: ortólogo de CG8515
RNAi-pMON97111: 001	Dv.105_CG1250_1; ativador de GTPase; envolvido em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG1250
RNAi-pMON97107: 001	Dv.107_CG14813; revestimento de vesícula COPI; envolvido em transporte protéico intracelular de Golgi para RE: ortólogo de CG14813
RNAi-pMON97115: 001	Dv.108_CG17248; n-sinaptobrevina; envolvida em transporte protéico intracelular : ortólogo de CG17248
RNAi-pMON97133: 001	Dv.113; função desconhecida; sequência exclusiva de WCR
RNAi-pMON97121: 001	Dv.122_CG3164; suposta atividade de veículo de cartucho de ligação de ATP: ortólogo de CG3164
RNAi-pMON97134: 001	Dv.127; função desconhecida; sem homologia com seres humanos

Tabela 4:

Constructos de dsRNA causadoras de níveis significativos de atrofia em Bioensaios de Alimentação com larvas de larva alfinete do milho do Sul (SCR).

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON96172: 001	Dv8_CG1088; suposta subunidade E de H+ATPase vacuolar: ortólogo de CG1088
RNAi-pMON96168: 001	Dv9_CG2331; suposta atividade de ATPase: ortólogo de CG2331
RNAi-pMON78424: 001	Dv.10_CG6141
RNAi-pMON96155: 002	Dv.10_CG6141; suposta proteína L9 ribossômica: ortólogo de CG6141
RNAi-pMON78425: 001	Dv.11_CG2746
RNAi-pMON96158: 002	Dv.11_CG2746; suposta proteína L19 ribossômica: ortólogo de CG2746
RNAi-pMON78416: 001	Dv.13_CG11276
RNAi-pMON78434: 001	Dv.14_CG17927_2; suposta cadeia pesada de miosina: ortólogo de CG17927
RNAi-pMON78435: 001	Dv.18_CG1404; suposta GTPase de RAN pequeno monomérico: ortólogo de CG1404
RNAi-pMON78449: 001	Dv.19_CG18174; suposta partícula reguladora de proteassomo, subcomplexo lid , rpn11: ortólogo de CG18174
RNAi-pMON78419: 001	Dv.20_CG3180
RNAi-pMON78420: 001	Dv.21_CG3320; suposto Rab1: ortólogo de CG3320
RNAi-pMON78414: 001	Dv.26_CG9261; suposta ATPase de troca de sódio/potássio: ortólogo de CG9261
RNAi-pMON97122: 001	C1_Dv35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero
RNAi-pMON97125: 001	C3_Dv35; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762; concatâmero
RNAi-pMON78427: 008	Dv.35_CG3762; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762
RNAi-pMON78428: 001	Dv.49_CG8055_1; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055_1

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pMON78442: 001	Dv.57_CG2968; suposta ATPase de exportação de hidrogênio: ortólogo de CG2968
RNAi-pMON96177: 001	Dv61_CG3725_1; suposta ATPase de cálcio: ortólogo de CG3725
RNAi-pMON96166: 001	Dv70_CG5771; suposta proteína Rab 11: ortólogo de CG5771
RNAi-pMON97126: 001	Dv88_CG8756; função desconhecida; contém domínio de ligação de quitina: ortólogo de CG8756
RNAi-pMON97111: 001	Dv105_CG1250_1; ativador de GTPase, envolvido em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG1250
RNAi-pMON97112: 001	Dv105_CG1250_2; ativador de GTPase; envolvido em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG1250
RNAi-pMON97107: 001	Dv107_CG14813; revestimento de vesícula COPI; envolvido em transporte protéico intracelular de Golgi para Re: ortólogo de CG14813
RNAi-pMON97121: 001	Dv122_CG3164; suposta atividade de veículo de cartucho de ligação de ATP: ortólogo de CG3164

Tabela 5:

Constructos de dsRNA causadoras de níveis significativos de mortalidade em Bioensaios de Alimentação com larvas de larva alfinete domilho do Sul (SCR)

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
RNAi-pIC17546: 003	LIB5462-091-A1-M1-G3 Dv1_CG6217 KNICKKOPF desconhecido
RNAi-pIC17504: 055	Sequência de subunidade 2 de V-ATPase de <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> , sequência completa EST servindo como controle positivo
RNAi-pMON96155: 001	Dv.10_CG6141; suposta proteína L9 ribossômica: ortólogo de CG6141
RNAi-pMON96158: 001	Dv.11_CG2746; suposta proteína L19

Vetor	Sequência expressa como dsRNA
	ribossômica: ortólogo de CG2746
RNAi-pMON78416: 001	Dv.13_CG11276
RNAi-pMON96154: 003	Dv.14_CG17927; suposta cadeia pesada de miosina: ortólogo de CG17927; células cultivadas em meio completo S.
RNAi-pMON78438: 001	Dv.17_CG10149; suposta subunidade p44.5 de proteassomo, rpn6: ortólogo de CG10149
RNAi-pMON78449: 001	Dv.19_CG18174; suposta partícula reguladora de proteassomo, subcomplexo lid, rpn11: ortólogo de CG18174
RNAi-pMON78440: 001	Dv.20_CG3180; suposta RNA polimerase II orientada por DNA; ortólogo de CG3180
RNAi-pMON96156: 001	Dv.20_CG3180; suposta subunidade de RNA polimerase II de 140kD: ortólogo de CG3180
RNAi-pMON78420: 001	Dv.21_CG3320; suposto Rab1: ortólogo de CG3320
RNAi-pMON78427: 006	Dv.35_CG3762; suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762
RNAi-pMON78428: 001	Dv.49_CG8055_1; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055_1
RNAi-pMON96177: 001	Dv61_CG3725_1; suposta ATPase de cálcio: ortólogo de CG3725
RNAi-pMON96166: 001	Dv70_CG5771; suposta proteína Rab 11: ortólogo de CG5771
RNAi-pMON96174: 001	Dv86_CG5055; suposto <i>bazooka</i> : ortólogo de CG5055
RNAi-pMON97111: 001	Dv105_CG1250_1; ativador de GTPase; envolvido em transporte protéico intracelular: ortólogo de CG1250
RNAi-pMON97107: 001	Dv107_CG14813; revestimento de vesícula COPI, envolvido em transporte protéico intracelular de Golgi para RE: ortólogo de CG14813

Exemplo 4

Transformação e Bioensaios de planta transgênica

[00191] Resumidamente, a sequência que codifica um constructo

de dsRNA, conforme descrito acima, é ligada, na extremidade 5', a uma sequência constituída por um promotor 35S, operacionalmente ligado a intron hsp70 de milho, e na extremidade 3' a uma sequência Nos3' de término de transcrição e poliadenilação. Esse cartucho de expressão é posicionado em direção descendente de um cartucho de seleção de glifosato. Estes cartuchos ligados são, então, colocados em um vetor funcional de transformação de planta do tipo *Agrobacterium tumefaciens*, utilizado para transformar tecido de milho tolerante a glifosato, e eventos selecionados e transferidos para o solo. As raízes da planta R0 são alimentadas com larvas de larva alfinete do milho ocidental (WCR, *Diabrotica virgifera*). As raízes do milho transgênico são dispostas em placas de Petri com meio MS0D, contendo antibióticos e glifosato para seleção *in vitro*. Duas larvas de WCR são infestadas por raiz, em cada placa, com a ponta de um pincel fino de pintura. As placas são lacradas com Parafilme para impedir que as larvas escapem. Os ensaios são colocados em incubador Percival a 27°C, 60% de UR em completa escuridão. A contaminação e qualidade larval são monitoradas. Depois de seis dias de alimentação em tecido da raiz, as larvas são transferidas para dieta de WCR em placa com 96 cavidades. As larvas são deixadas alimentando-se na dieta por oito dias, fazendo com que todo o ensaio dure, no total, quatorze dias. A massa e a sobrevivência das larvas são registradas para análise. É conduzida análise de uma via por ANOVA e teste de Dunnett, nos dados de massa larval, quanto à significância estatística, em comparação com controle negativo não-transformado. A atrofia de larvas de WCR é medida, após alimentação em dois eventos, e comparada ao crescimento de larvas alimentadas em plantas do controle negativo.

[00192] Plantas transgênicas de milho (R0) geradas são plantadas em vasos de 25,40 cm (10 polegadas), contendo solo Metromix, após

atingir tamanho apropriado. Quando as plantas atingem o estágio de crescimento V4, aproximadamente 1000 ovos de larva alfinete do milho ocidental (WCR, *Diabrotica virgifera*) são infestados na área da raiz. Milho não-transgênico do mesmo genótipo é infestado em um estágio semelhante de crescimento, para servir como controle negativo. Os ovos são pré-incubados para que a incubação ocorra em 24 horas da infestação. É permitido que as larvas alimentem-se nos sistemas de raízes por 3 semanas. As plantas são removidas do solo e lavadas para que as raízes possam ser avaliadas quanto à alimentação de larvas. O dano causado às raízes é classificado, empregando uma Escala de Lesão de Nódulo (NIS), para pontuação do nível de danos, em que 0 indica ausência de dano, 1 indica que um nódulo de raiz é podado em 3,81 cm (1,5 polegada), 2 indica que 2 nódulos são podados, enquanto que 3 indica que 3 nódulos são podados. Como as plantas que estão sendo utilizadas para avaliação são retiradas diretamente de cultura de tecidos, após transformação, e como os eventos de transformação são únicos, somente uma única planta é avaliada por evento, nesta ocasião. As plantas no ensaio que apresentam sinais ou sintomas de alimentação larval indicam que foi obtido êxito na infestação. Raízes de plantas de controle negativo são moderada a gravemente danificadas, em média, enquanto que raízes de plantas transgênicas fornecem controle substancial de alimentação larval, com aproximadamente 0,2 ou menos na Escala de Lesão de Nódulos.

Exemplo 5

Implementação de supressão de gene de insetos-praga, empregando um método de silenciamento mediado por ta-siRNA

[00193] Um método alternativo para silenciar genes em pragas de plantas usa a classe recentemente descoberta de pequeno RNA interferente de atuação transversa (ta-siRNA) (Dalmay et al., 2000;

Mourrain et al., 2000; Peragine et al, 2004; Vazquez et al, 2004). O ta-siRNA é derivado de trans-critos de RNA de fita simples, que são visados por mRNA que ocorrem naturalmente dentro da célula. Métodos que usam microRNA para acionar o ta-siRNA para silenciar genes em plantas são descritos no Pedido de Patente Provisional US Serial Nº 60/643 136 (Carrington et al. 2004), cujo conteúdo é aqui incorporado em sua totalidade por referência neste pedido. Pelo menos um miRNA específico da praga, expresso nas células epiteliais do intestino de larvas alfinete de milho, é identificado. Este miRNA específico da praga é, então, utilizado para identificar, pelo menos, uma sequência alvo de miRNA, expressa na célula. A sequência alvo correspondente é uma sequência curta, contendo não mais do que 21 nucleotídeos contíguos que, quando parte de um RNA é transcrito e entra em contacto com o seu miRNA correspondente, em um tipo de célula com via funcional de RNAi, leva a clivagem mediada por cortador do referido transcrito. Uma vez identificadas sequências alvo de miRNA, pelo menos uma destas é fundida a uma segunda sequência que corresponde a uma parte de um gene da praga, a ser silenciado utilizando este método. Por exemplo, a(s) sequência(s) alvo(s) de miRNA é fundida a qualquer sequência de SEQ ID NO: 1 até SEQ ID NO: 906, ou fragmento destas, como uma sequência do gene da ATPase vacuolar (V-ATPase) de larva alfinete de milho. A sequência alvo do miRNA pode ser posicionada na extremidade 5', a extremidade 3' ou ser encaixada no meio da sequência alvo. Pode ser preferível utilizar múltiplas sequências alvos de miRNA, correspondendo a múltiplos genes de miRNA, ou usar a mesma sequência alvo, várias vezes, na quimera da sequência alvo de miRNA e a sequência alvo do gene. A sequência do gene alvo pode ter qualquer comprimento, no mínimo com 21 bp.

[00194] A quimera da(s) sequência(s) alvo de miRNA e da

sequência do gene alvo é expressa em células de plantas, utilizando qualquer número de promotor e outros elementos reguladores de transcrição apropriados, desde que a transcrição ocorra em tipos de células que possam ser fornecidas na dieta da praga, por exemplo, raízes de milho para controle de larva alfinete de milho.

[00195] Este método pode ter a vantagem adicional de fornecer moléculas mais longas de RNA à praga-alvo. Tipicamente, dsRNAs produzido em plantas são rapidamente processados por Dicer em RNA curto, que pode não ser efetivo quando alimentado de modo exógeno a algumas pragas. Neste método, é produzido um transcrito de fita simples na célula da planta, que é absorvido pela praga e convertido em dsRNA, na célula da praga, onde é processado em seguida para ta-siRNA, capaz de silenciar um ou mais genes, após a transcrição, em uma ou mais pragas-alvo.

Exemplo 6

Método para fornecimento de sequência de DNA para silenciamento de gene mediado por dsRNA

[00196] Este exemplo ilustra um método que fornece uma sequência de DNA para silenciamento de gene mediado por dsRNA. Mais especificamente, este exemplo descreve a seleção de um DNA melhorado, que pode ser utilizado em silenciamento de gene mediado por dsRNA, por (a) seleção de um gene-alvo de uma sequência inicial de DNA, incluindo mais de 21 nucleotídeos contíguos; (b) identificação de pelo menos uma sequência menor de DNA, derivada de regiões da sequência inicial de DNA, consistindo em regiões para as quais é previsto não gerar polipeptídeos indesejados e não exibir identidade com sequências conhecidas, como homólogos/ortólogos, e (c) seleção de uma sequência de DNA, para silenciamento de gene mediado por dsRNA, que inclua, pelo menos, a sequência menor de DNA. Polipeptídeos indesejados incluem, entre outros, polipeptídeos

homólogos de polipeptídeos alérgenos e polipeptídeos homólogos de toxinas polipeptídicas conhecidas.

[00197] Foi demonstrado que a V-ATPase do WCR funciona, em ensaios de alimentação de larva alfinete de milho, para testar o silenciamento mediado por dsRNA, como meio de controle de crescimento larval. Uma sequência de cDNA de um gene-alvo, como o gene da ATPase vacuolar (V-ATPase) de larva alfinete do milho ocidental (WCR) (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte), é selecionada para ser utilizada como uma sequência inicial de DNA. Esta sequência inicial de DNA pode ser investigada para serem identificadas regiões de cada fragmento contíguo, contando, no mínimo, com 21 nucleotídeos, que tenha um número de combinação inferior a 21 de 21 nucleotídeos contíguos de sequências conhecidas de vertebrados. É feita a identificação de segmentos da sequência, que tenham mais de aproximadamente 100 nucleotídeos contíguos e que não atinjam esta marca de 21/21. Dessa forma, critérios, incluindo extensão de segmento, teor de GC, sequência, função prevista, com base em sequência ou função de um gene correspondente em modelo de organismo, além de estrutura secundária prevista (por exemplo, Elbashir, et al., 2001b), podem ser utilizados para selecionar e criar sequência(s) para uso. Combinações diferentes destes segmentos de sequência são combinadas para construir sequências quiméricas de DNA para expressão como RNA e uso em bioensaios de alimentação de insetos, conforme descritos acima.

Exemplo 7

Resultados adicionais de Bioensaios de Alimentação de Insetos com sequências selecionadas de banco de dados de EST

[00198] Este exemplo ilustra sequências adicionais constatadas serem efetivas em causar atrofia e/ou mortalidade larval, quando ingeridas por larvas alfinete de milho, sob a forma de RNA de fita

dupla. Métodos para cultura de larvas alfinete de milho, aplicação de dsRNA e bioensaios de insetos são conforme foram descritos nos Exemplos 1-3. Os resultados dos estudos confirmaram níveis significativos ($p < 0,05$) de atrofia e/ou mortalidade larval, usando dsRNAs contendo partes de sequências homólogas de uma variedade de classes diferentes de genes. As sequências e vetores, que levaram à atrofia e/ou mortalidade significativa, e a SEQ ID NO correspondente para a sequência expressa como dsRNA são fornecidos na Tabela 6 abaixo. O pMON98503, exemplo de vetor binário, utilizado em transformação de milho, contém os seguintes elementos entre os limites direito e esquerdo do T-DNA, para transformação em célula de planta: e35S – HSP70 – DV49 (orientação antissenso) – espaçador universal – DV49 (orientação sentido) – hsp17; ACT (promotor e intron) – sinalização de trânsito CTP2 – CP4 – NOS. O pMON98504, outro exemplo de vetor binário utilizado em transformação de milho, contém os seguintes elementos, entre os limites direito e esquerdo: e35S – HSP70 – C1 (orientação antissenso) - espaçador universal – C1 (orientação sentido) – hsp17; ACT (promotor e intron) – sinalização de trânsito CTP2 – CP4 – NOS.

Tabela 6:

Constructos adicionais de dsRNA, demonstrando efeito significativo sobre atrofia e mortalidade em Bioensaios de Alimentação com larva alfinete do milho do Sul ou larva alfinete do milho ocidental.

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON98356	Dv164; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	726
pMON98354	Dv172; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	727
pMON97191	Dv189; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	728
pMON98359	Dv200; função desconhecida, sequência exclusiva de WCR	729

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON38880	Dv207_F39H11.5; suposta pbs-7, endopeptidase: ortólogo de F39H11.5	730
pMON101054	Dv208_F58F12_1; suposta F1F0-ATP sintase mitocondriana, subunidade delta/ATP16: ortólogo de F58F12_1	731
pMON98437	Dv210_K11H12_2; suposto rpl-15, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de: K11H12_2	732
pMON98435	Dv211_R12E2_3; suposto rpn-8, fator de inibição de tradução, complexo regulador de proteassomo 26S, subunidade RPN8: ortólogo de R12E2_3	733
pMON98447	Dv212_C17H12_14; suposto vha-8, ATPase de exportação de hidrogênio: ortólogo de C17H12_14	734
pMON98448	Dv213_B0464_1; suposto drs-1, tRNA ligase: ortólogo de B0464_1	735
pMON101059	Dv214_F53G12_10; suposto rpl-7, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F53G12_10	736
pMON98442	Dv216_C52E4_4; suposto rpt-1, subunidade de ATPase do complexo regulador 19S do proteassomo: ortólogo de: C52E4_4	737
pMON98441	Dv218_K01G5_4; suposto ran-1, GTPase pequena monomérica: ortólogo de K01G5_4	738
pMON98440	Dv219_C15H11_7; suposto pas-1, endopeptidase: ortólogo de C15H11_7	739
pMON101081	Dv223_R10E11.1; suposto cbp-1, homólogo dos co-fatores de transcrição CBP e p300: ortólogo de R10E11.1	740
pMON101050	Dv224_F11C3_3; suposto unc-54, ligação de ATP; atividade motora: ortólogo de F11C3_3	741
pMON101051	Dv225_C37H5_8; suposto hsp-6, proteína 6 de ataque por calor: ortólogo de C37H5_8	742

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON38888	Dv226_C47E12.5;suposto uba-1, enzima ativadora de ubiquitina: ortólogo de C47E12.5	743
pMON38887	Dv227_F54A3.3;suposto componente do complexo Chaperonina, subunidade faixa TCP-1: ortólogo de F54A3.3	744
pMON101110	Dv229_D1081.8;suposta ligação Myb semelhante de DNA: ortólogo de D1081.8	745
pMON101052	Dv230_F55A11_2 ; suposto sin-3, veículo de proteína; syntaxina: ortólogo de F55A11_2	746
pMON101107	Dv231_C30C11.1;suposta proteína L32 de mitocôndria e ribossomo: ortólogo de C30C11.1	747
pMON101055	Dv232_B0250_1; suposto rpl-2, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de B0250_1	748
pMON98446	Dv233_F54C9_5; suposto rpl-5, constituinte estrutural de ligação de 5S de rRNA de ribossomo: ortólogo de F54C9_5	749
pMON101138	Dv235_C04F12.4 ;suposto rpl-14, proteína L14 de subunidade grande ribossômica: ortólogo de C04F12.4	750
pMON98449	Dv236_C01G8_5; suposto erm-1, família de Ezrina/Radixina/Moesina (ERM) de ligantes citoesqueléticos: ortólogo de C01G8_5	751
pMON98439	Dv237_F57B9_10; suposto rpn-6, Partícula Reguladora de proteassomo, diferente de ATPase: ortólogo de F57B9_10	752
pMON98436	Dv240_F53A3_3; suposto rps-22, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F53A3_3	753
pMON101078	Dv241_F32H2.5; suposta álcool desidrogenase, zinco dependente: ortólogo de F32H2.5	754
pMON101058	Dv242_B0336_2; suposto arf-1, GTPase pequena monomérica: ortólogo de B0336_2	755

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON101057	Dv244_C14B9_7; suposto rpl-21, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de C14B9_7	756
pMON98444	Dv245_C26F1_4; suposto rps-30, Proteína Ribossômica, subunidade Pequena: ortólogo de C26F1_4	757
pMON98434	Dv247_C13B9_3; suposta subunidade delta do complexo coatâmero (COPI): ortólogo de C13B9_3	758
pMON101053	Dv248_F38E11_5; suposto complexo COPI de revestimento de vesícula: ortólogo de F38E11_5	759
pMON98445	Dv249_F37C12_9; suposto rps-14, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F37C12_9	760
pMON101056	Dv250_CD4_6; suposto pas-6, endopeptidase: CD4_6	761
pMON101104	Dv251_D1007.12 ;suposto rpl-24.1, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de D1007.12	762
pMON101088	Dv252_C49H3.11; suposto rps-2, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de C49H3.11	763
pMON101079	Dv253_C26D10.2; suposto hel-1, RNA helicase, dependente de ATP: ortólogo de C26D10.2	764
pMON101085	Dv254_B0336.10; suposto rpl-23, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de B0336.10	765
pMON38879	Dv255_C36A4.2;suposto membro da família do Citocromo P450: ortólogo de C36A4.2	766
pMON101087	Dv256_K05C4.1; suposto pbs-5, subunidade beta de proteassomo: ortólogo de K05C4.1	767
pMON101082	Dv257_F29G9.5; suposto rpt-2, complexo regulador de proteassomo 26S: ortólogo de F29G9.5	768

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON101084	Dv258_F40F8.10; suposto rps-9, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F40F8.10	769
pMON101083	Dv259_K07D4.3; suposto rpn-11, complexo regulador de proteassomo 26, subunidade RPN11: ortólogo de K07D4.3	770
pMON101080	Dv260_F49C12.8; suposto rpn-7, Partícula Reguladora de proteassomo, diferente de ATPase: ortólogo de F49C12.8	771
pMON101115	Dv261_D1054.2; suposto pas-2, endopeptidase: ortólogo de D1054.2	772
pMON101141	Dv263_F55A3.3; suposto metal-exopeptidase: ortólogo de F55A3.3	773
pMON101126	Dv264_F56F3.5; suposto rps-1, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F56F3.5	774
pMON101133	Dv266_C09D4.5; suposto rpl-19, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de C09D4.5	775
pMON38881	Dv268_R06A4.9; suposto complexo I de fator de poliadenilação, subunidade PFS2: ortólogo de R06A4.9	776
pMON101135	Dv271_F37C12.4; suposto rpl-36, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F37C12.4	777
pMON101132	Dv273_F54E7.2; suposto rps-12, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F54E7.2	778
pMON101139	Dv274_C23G10.4 ; suposto rpn-2, Partícula Reguladora de proteassomo, diferente de ATPase: ortólogo de C23G10.4	779
pMON101130	Dv275_C03D6.8; suposto rpl-24.2, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de C03D6.8	780
pMON101119	Dv276_C26E6.4; suposta RNA polimerase orientada por DNA: ortólogo de C26E6.4	781
pMON101134	Dv277_R13A5.8 ; suposto rpl-9, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de R13A5.8	782

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON101127	Dv279_F42C5.8; suposto rps-8, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F42C5.8	783
pMON101122	Dv280_F13B10.2; suposto rpl-3, subunidade L3 ribossômica grande: ortólogo de F13B10.2	784
pMON101116	Dv281_T05C12.7; suposto cct-1, componente do complexo Chaperonina, subunidade alfa TCP-1: ortólogo de T05C12.7	785
pMON101125	Dv282_F07D10.1; suposto rpl-11.2, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F07D10.1	786
pMON38883	Dv283_T05H4.6; suposto fator 1 (eRF1) de liberação de cadeia de peptídeo: ortólogo de Dv283_T05H4.6	787
pMON101124	Dv284_C47E8.5; suposto daf-21, proteína 90 de choque por calor, : ortólogo de C47E8.5	788
pMON101120	Dv285_M03F4.2; suposto act-4, actina: ortólogo de M03F4.2	789
pMON101137	Dv286_F25H5.4; suposto eft-2, fator de alongamento de tradução: ortólogo de F25H5.4	790
pMON101140	Dv287_F26D10.3; suposto hsp-1, proteína de choque por calor: ortólogo de F26D10.3	791
pMON101117	Dv288_F28D1.7; suposto rps-23, constituinte estrutural de ribossomo: ortólogo de F28D1.7	792
pMON38886	Dv290_CG11979; suposta ATPase de exportação de Hidrogênio: ortólogo de CG11979	793
pMON38885	Dv291_CG13628; suposta ATPase de exportação de Hidrogênio: ortólogo de CG13628	794
pMON101103	Dv293_CG31237; suposta RNA polimerase II, orientada por DNA: ortólogo de CG31237	795

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON101096	Dv294_CG8669; suposto fator de transcrição criptocefal, envolvido em ciclo de troca de proteção externa, pupariação e metamorfose: ortólogo de CG8669	796
pMON101095	Dv295_CG8048; suposta subunidade C de H ⁺ ATPase Vacuolar de 44kD: ortólogo de CG8048	797
pMON101100	Dv298_CG9032; suposta ATPase de exportação de Hidrogênio: ortólogo de CG9032	798
pMON101111	Dv299_CG17369; suposta ATPase de exportação de Hidrogênio: ortólogo de CG17369	799
pMON101129	Dv303_CG4152; suposta RNA helicase dependente de ATP: ortólogo de CG4152	800
pMON101136	Dv305_CG4916; suposta RNA helicase dependente de ATP: ortólogo de CG4919	801
pMON101131	Dv315_CG9160; suposta NADH desidrogenase: ortólogo de CG9160	802
pMON101123	Dv316_CG8764; suposta ubiquinol-citocromo-c redutase: ortólogo de CG8764	803
pMON98364	C4_Dv49_CG8055 concatâmero; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055	804
pMON98365	C5_Dv49_CG8055 concatâmero; suposta atividade de ligação, veículo: ortólogo de CG8055 .	805
pMON98368	Concatâmero C6 de alvos altamente efetivos de WCR, ~50% de critério de GC, consistindo em segmentos na ordem 5'-3' de Dv26, Dv49, Dv23, Dv20, Dv13, Dv22, Dv18	806
pMON98369	Concatâmero C7 de alvos específicos de insetos, ~50% de critério de GC, consistindo em segmentos na ordem 5'-3' de Dv6, Dv1, Dv88, Dv93, Dv4, Dv113, Dv127, Dv99	807
pMON98372	Concatâmero C8; suposta ATPase de troca sódio/potássio: ortólogo de CG9261	808

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON98373	Concatâmero C9; suposta ATPase de troca sódio/potássio: ortólogo de CG9261	809
pMON98366	Concatâmero C10 de genes com supostamente o mesmo/diferente modo de ação, ~50% de critério de GC	810
pMON98367	Concatâmero C12 de alvos altamente efetivos de WCR, ~50% de critério de GC, consistindo em segmentos na ordem 5'-3' de Dv23-Dv13-Dv26-Dv18-Dv49-Dv22-Dv20.	811
pMON98371	Concatâmero C14 de genes-alvo ativos em vários organismos, ~50% de critério de GC	812
pMON98503	Compreendendo o DV49, suposta subunidade do complexo ESCRT-III (complexo de seleção endossômica, necessário para transporte III) do <i>Diabrotica virgifera</i>	820
pMON98504	Compreendendo o suposto Vha68-2: ortólogo de CG3762 ; concatâmero C1 com 250bp;	821
pMON102862	Dv319_ CG14750;suposto ESCRTII, Vps25: ortólogo de CG14750	835
pMON102863	Dv320_ CG9712;suposto ESCRTI, Vps23: ortólogo de CG9712	836
pMON102861	Dv321_ CG12770;suposto ESCRTI, Vps28: ortólogo de CG12770	837
pMON102865	Dv322_ CG14542;suposto ESCRT III, Vps2: ortólogo de CG14542	838
pMON102866	Dv323_ CG4071;suposto ESCRT III, Vsp20: ortólogo de CG4071	839
pMON102871	Dv326_ CG3564;suposto componente de veículo de proteína do revestimento COPI de vesícula: ortólogo de CG3564	840
pMON102873	Dv327_ CG6223;suposto coatâmero, componente de revestimento COPI da vesícula: ortólogo de CG6223	841
pMON102877	Dv328_ CG6948;suposta cadeia leve da clatrina, revestimento de orifício revestido: ortólogo de CG6948	842

Vetor	Sequência expressa como dsRNA	SEQ ID NO
pMON102872	Dv330_CG9543;suposto revestimento COPI de vesícula: ortólogo de CG9543	843
pMON102879	Dv331_CG5183;suposta ligação de sequência KDEL: ortólogo de CG5183	844
pMON102867	Dv335_F11C1.6;suposto nhr-25, ligação de DNA: ortólogo de F11C1.6	845
pMON102870	Dv337_CG18734;suposta furina 2, endopeptidase do tipo serina: ortólogo de CG18734	846
pMON102875	Dv329_CG7961;suposto coatâmero, componente de revestimento COPI de vesícula: ortólogo de CG7961	874

[00199] Os testes de eficácia foram conduzidos da forma a seguir, utilizando progênie de planta de milho, transformadas com constructos selecionadas de controle de insetos:

1. Sete dias após plantio: incubados 10.000 ovos de WCR por evento (10 plantas por evento) a 25 °C, 60%UR em completa escuridão por sete dias.

2. Quatorze dias após infestação: as plantas são transplantadas de 4 vasos de turfa de 10,1 cm (4") para vasos de 20,3 cm (8"); amostras de ponta de raiz v4 podem ser coletadas para estudos de expressão gênica.

3. Quatorze dias após plantio: lavagem dos ovos de WCR, retirando-os do solo. Colocar os ovos e selo em tela de 60 mesh e colocar uma tela de trama 30 em cima da tela de 60 mesh para proteger os ovos da corrente de água. Lavar abundantemente com água morna, empregando bocal pulverizador até que o solo seja removido.

4. Suspender os ovos em solução de ágar Difco a 2% (p/v), 28 ml de solução por 1 ml de ovos. Os ovos são infestados no solo em aproximadamente 3 ou 4 alíquotas com, por exemplo, pipeta repetidora de Eppendorf, aproximadamente 1000 ovos por planta. São feitos buracos no solo com espátula antes da infestação e

cobertos após a infestação.

5. Vinte e oito dias após plantio: amostras da ponta da raiz v8 são coletadas para estudos de expressão gênica.

6. Trinta e cinco dias após plantio: o ensaio é avaliado. As plantas são cortadas com poda em curva, deixando aproximadamente 6" de caule. Estacas da planta, contendo a informação do evento são furadas e presas ao caule. É removido o máximo de solo quanto possível do sistema de raízes. O restante do solo é lavado e retirado com uma mangueira com pulverizador.

7. As raízes são examinadas e classificadas quanto a dano causado às raízes, empregando a escala NIS de Olsen (0-3) para dano causado por larva de WCR.

[00200] A Figura 1 e Figura 2 ilustram os resultados de controle de insetos, obtidos após o teste de plantas de milho F1 (derivadas de plantas transformadas com pMON98503 ou pMON98504) com WCR. Em testes de eficácia em câmara de crescimento, executados essencialmente conforme é descrito acima, pontuações de NIS, no patamar ou abaixo de dano econômico foram observados em progênie de eventos derivados por transformação com pMON98503 ou pMON98504.

[00201] Sequências de toda extensão de EST do DNA foram montadas para genes selecionados, descritos nos Exemplos 3 e 7, exibindo atividade significativa contra larva alfinete do milho ocidental. Estas sequências EST são listadas na Tabela 7:

Tabela 7:

Sequências montadas EST para WCR alvos.

Sequência montada	SEQ ID NO
Extensão completa de Dv9 (aka Apple); suposto ortólogo de CG2331	813
Extensão completa de Dv10 (Rp19); suposto ortólogo de CG6141	814

Sequência montada	SEQ ID NO
Extensão completa de Dv11 (Rpl19); suposto ortólogo de CG2746	815
Extensão completa de Dv13 (Rps4); suposto ortólogo de CG11276	816
Extensão completa de Dv35 de v-ATPase A; ortólogo de CG3762	817
Extensão completa de Dv49, ortólogo de CG8055	818
Extensão completa de Dv248, suposto ortólogo de CG6699	819

Exemplo 8

Criação e resultados de eficácia para sequências do Dv49 e Dv248

[00202] Partes das sequências montadas EST e adjacentes do Dv49 (SEQ ID NO: 818) e Dv248 (SEQ ID NO: 819) foram selecionadas para ensaios adicionais de bioatividade, com base em critérios que incluíam função prevista, fenótipo de mutantes knockout de regiões codificadoras correspondentes em outros organismos, extensão de segmento, teor de GC, semelhança com sequências conhecidas e estrutura secundária prevista (por exemplo, Elbashir, et al., 2001b). As sequências respectivas do Dv49 e Dv248 foram sintetizadas in vitro, com base em sua atividade prevista contra WCR, tanto individualmente como agrupada, conforme apresentado nas Figuras 3-4 e Tabela 8, e aplicadas a larvas de WCR.

Tabela 8:

Fragmentos de Dv49 e Dv248, avaliados quanto à eficácia, em WCR.

Fragmento	SEQ ID NO
F1	822
F2	823
F3	824
F4	825
F5	826

Fragmento	SEQ ID NO
F6	827
F7	828
F8	829
F9	830
F10	831
F11	832
F12	833
F13	834

[00203] Os fragmentos F1-F3 correspondem a partes do transcrito Dv49 de extensão completa. Os fragmentos F4-F6 correspondem a partes do transcrito Dv48 ou de região do flanco. Os fragmentos F7-F13 são concatâ-meros de dois ou mais fragmentos F1-F6, conforme apresentado na Figura 4. O fragmento F13 (SEQ ID NO: 834) representa o concatâmero C38 (Dv49-Dv248).

[00204] Os dados de dose-resposta, para F1-F13, são apresentados nas Figuras 5-7. Conforme apresentado na Figura 5, a atividade (% de mortalidade larval) dos fragmentos F4-F6, compreendendo sequências derivadas de Dv248 (Figura 4), foi significativamente melhor do que o controle quando alimentado a larvas de WCR em 0,1 ppm. O fragmento F6 exibiu atividade significativa quando também alimentado em 0,02 ppm. A atividade do fragmento F5, na dose mais baixa, é possivelmente um artefato, uma vez que as larvas sobreviventes não exibiram atrofia.

[00205] Conforme apresentado na Figura 6, cada fragmento F7-F10 exibe atividade estatisticamente significativa quando alimentado a larvas de WCR em 0,1 ppm. Os fragmentos F9 e F10 exibiram também atividade estatisticamente significativa quando alimentados a larvas de WCR em 0,02 ppm, sendo que o fragmento F10 exibiu também atividade estatisticamente significativa quando alimentado a larvas de WCR em 0,01 ppm. A atividade de F8, em 0,01 ppm, pode ser um artefato.

[00206] Conforme apresentado na Figura 7, os fragmentos F11-F13 exibem atividade estatisticamente significativa quando alimentados a larvas de WCR em 0,02 ppm ou acima. Adicionalmente, os fragmentos maiores (F12 e F13) exibem atividade em 0,005 ppm e acima.

Exemplo 9

Sequências adicionais de concatâmero ativo, derivadas do Concatâmero C6

[00207] Conforme apresentado na Tabela 9, porções do concatâmero C6 ativo (SEQ ID NO: 806), derivado de pMON98368, foram identificadas em bioensaios de dieta sobreposta (conduzidos conforme descritos, por exemplo no Exemplo 2), como inibindo o crescimento e/ou sobrevivência de larva alfinete de milho (WCR). O concatâmero C6 de extensão completa contém 7 subfragmentos alvo de 70bp cada, conforme observado na Tabela 6 e Tabela 9.

Tabela 9:

Eficácia do concatâmero C6 de extensão completa e subporções selecionadas em bioensaio de dieta de larva alfinete de milho (SEQ ID NOs: 806, 847-873).

Concatâmero	Segmentos	% de mortalidade em 1 ppm	SEQ ID NO:
C6_extensão completa	Dv26-Dv49-Dv23-Dv20-Dv13-Dv22-Dv18	100	806
C6.1	Dv26-Dv49	35,3	847
C6.2	Dv26-Dv49-Dv23	57,1	848
C6.3	Dv26-Dv49-Dv23-Dv20	84,7	849
C6.4	Dv26-Dv49-Dv23-Dv20-Dv13	51	850
C6.5	Dv26-Dv49-Dv23-Dv20-Dv13-Dv22	41,3	851
C6.6	Dv49-Dv23	94,6	852
C6.7	Dv49-Dv23-Dv20	75,6	853

Concatâmero	Segmentos	% de mortalidade em 1 ppm	SEQ ID NO:
C6.8	Dv49-Dv23-Dv20-Dv13	50	854
C6.9	Dv49-Dv23-Dv20-Dv13-Dv22	56,4	855
C6.10	Dv49-Dv23-Dv20-Dv13-Dv22-Dv18	52,5	856
C6.11	Dv23-Dv20	74,6	857
C6.12	Dv23-Dv20-Dv13	63,4	858
C6.13	Dv23-Dv20-Dv13-Dv22	58,5	859
C6.14	Dv23-Dv20-Dv13-Dv22-Dv18	60,8	860
C6.15	Dv20-Dv13	57,5	861
C6.16	Dv20-Dv13-Dv22	20	862
C6.17	Dv20-Dv13-Dv22-Dv18	44,8	863
C6.18	Dv13-Dv22	71,1	864
C6.19	Dv13-Dv22-Dv18	52,5	865
C6.20	Dv22-Dv18	44,6	866
C6.28	Dv26	58,9	867
C6.29	Dv49	72,3	868
C6.30	Dv23	71,9	869
C6.31	Dv20	62,6	870
C6.32	Dv13	54,2	871
C6.33	Dv22	56,7	872
C6.34	Dv18	44,6	873

[00208] O concatâmero C7 de extensão completa, contém 8 subfragmentos alvo de 70 bp cada, conforme observado na Tabela 6. Da mesma forma, o concatâmero C12 de extensão completa contém 7 subfragmentos alvo, provenientes de Dv23-Dv13-Dv26-Dv18-Dv49-Dv22-Dv20, variando em extensão entre 53-80 bp, conforme observado na Tabela 6 e Tabela 10.

Tabela 10:

Composição de concatêmeros C12 de extensão completa e subporções selecionadas (SEQ ID NOs: 811, 887-892).

Concatâmero	Segmentos	Sequência incluída (SEQ ID NO) em direção 5'-3'
C12_extensão completa	Dv23-Dv13-Dv26-Dv18-Dv49-Dv22-Dv20	811
C12.1	Dv23-Dv13	887
C12.2	Dv23-Dv13-Dv26	888
C12.3	Dv23-Dv13-Dv26-Dv18	889
C12.4	Dv23-Dv13-Dv26-Dv18-Dv49	890
C12.5	Dv23-Dv13-Dv26-Dv18-Dv49-Dv22	891
C12.6	Dv13-Dv26	892
C12.7	Dv13-Dv26-Dv18	893
C12.8	Dv13-Dv26-Dv18-Dv49	894
C12.9	Dv13-Dv26-Dv18-Dv49-Dv22	895
C12.10	Dv13-Dv26-Dv18-Dv49-Dv22-Dv20	896
C12.11	Dv26-Dv18	897
C12.12	Dv26-Dv18-Dv49	898
C12.13	Dv26-Dv18-Dv49-Dv22	899
C12.14	Dv26-Dv18-Dv49-Dv22-Dv20	900
C12.15	Dv18-Dv49	901
C12.16	Dv18-Dv49-Dv22	902
C12.17	Dv18-Dv49-Dv22-Dv20	903
C12.18	Dv49-Dv22	904
C12.19	Dv49-Dv22-Dv20	905
C12.20	Dv22-Dv20	906

[00209] A Tabela 11 lista sequências adicionais para uso em outros co-leópteros-praga visados, incluindo *Diabrotica* sp. e outros Coccinellidae e Chrysomelidae.

Tabela 11:

Sequências adicionais de coleópteros visados.

Sequência e origem	SEQ ID NO
Dbar248_CG6699 (<i>D. barberi</i>)	875
Dbal248_CG6699 (<i>D. balteata</i>)	876
Du248_CG6699 (<i>D. undecimpunctata howardi</i>)	877
Dz248_CG6699 (<i>D. virgifera zea</i>)	878
Dv248_CG6699 (<i>D. virgifera virgifera</i>)	879
Ev248_CG6699 (<i>Epilachna varivestis</i>)	880
Ld248_CG6699 (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	881
Dbal49_CG8055_2 (<i>D. balteata</i>)	882
Db49_CG8055_2 (<i>D. barberi</i>)	883
Du49_CG8055_2 (<i>D. undecimpunctata howardi</i>)	884
Dz49_CG8055_2 (<i>D. virgifera zea</i>)	885
Dv49_CG8055_2 (<i>D. virgifera virgifera</i>)	886

[00210] Todas as composições e métodos expostos e reivindicados neste pedido podem ser feitos e executados sem experimentação indevida, à luz da presente exposição. Embora as composições e métodos desta invenção tenham sido descritos em termos das concretizações precedentes ilustrativas, será evidente para versados na técnica que variações, mudanças, modificações e alterações poderão ser aplicadas à composição, os métodos e nas etapas ou sequência das etapas dos métodos aqui descritos, sem distanciamento do verdadeiro conceito, espírito e escopo da invenção. Mais especificamente, será evidente que certos agentes bioquímica e fisiologicamente relacionados poderão ser substituídos pelos agentes aqui descritos, embora os mesmos resultados, ou semelhantes, seriam alcançados. Todos esses substitutos e modificações

semelhantes e evidentes para ver-sados na técnica são considerados incluídos no espírito, escopo e conceito da invenção, conforme definidos pelas reivindicações anexadas.

Referências

[00211] As referências a seguir, na medida em que forneçam exemplos de procedimentos e outros detalhes complementares àqueles expostos no presente, são especificamente aqui incorporadas por referência neste pedido:

U.S. PATENT: 4,245,432; U.S. PATENT 4,272,417; U.S. PATENT 4,339,456; U.S. PATENT 4,372,080; U.S. PATENT 4,383,391; U.S. PATENT 4,465,017 ; U.S. PATENT 4,536,475; U.S. PATENT 4,634,587; U.S. PATENT 4,693,977; U.S. PATENT 4,735,015; U.S. PATENT 4,759,945; U.S. PATENT 4,876,197; U.S. PATENT 4,880,734; U.S. PATENT 4,886,937; U.S. PATENT 4,959,317; U.S. PATENT 5,080,925; U.S. PATENT 5,107,065; U.S. PATENT 5,107,787; U.S. PATENT 5,231,020; U.S. PATENT 5,283,184; U.S. PATENT 5,300,127; U.S. PATENT 5,302,523; U.S. PATENT 5,328,942; U.S. PATENT 5,384,253; U.S. PATENT 5,389,399; U.S. PATENT 5,464,765; U.S. PATENT 5,501,967; U.S. PATENT 5,527,695; U.S. PATENT 5,538,877; U.S. PATENT 5,538,880; U.S. PATENT 5,550,318; ; U.S. PATENT 5,554,445; U.S. PATENT 5,563,055; U.S. PATENT 5,580,544; U.S. PATENT 5,591,616; U.S. PATENT 5,593, 874; U.S. PATENT 5,622,003; U.S. PATENT 5,633,435; U.S. PATENT 5,661,103; U.S. PATENT 5,698,425; U.S. PATENT 5,712,135; U.S. PATENT 5,759,829; U.S. PATENT 5,780,708; U.S. PATENT 5,789,214; U.S. PATENT 5,791,084; U.S. PATENT 5,804,693; U.S. PATENT 5,834,447; U.S. PATENT 5,837,848; U.S. PATENT 5,849,320; U.S. PATENT 5,876,739; U.S. PATENT 5,882,713; U.S. PATENT 5,891,246; U.S. PATENT 5,918,413; U.S. PATENT 5,939,356; U.S. PATENT 6,118,047; U.S. PATENT 6,326,193; U.S. PATENT 6,489,542; U.S. PATENT 6,506,559;

U.S. PATENT APPLIC. SER. 10/205,189; U.S. PATENT APPLIC. SER. 10/465,800; U.S. PATENT APPLIC. SER. 60/643,136

U.S. PATENT PUBLN. 2002/0048814; U.S. PATENT PUBLN. 2002/0048814; U.S. PATENT PUBLN. 2003/0018993; U.S. PATENT PUBLN. 2003/0061626; U.S. PATENT PUBLN. 2003/0150017; U.S. PATENT PUBLN. 2003/0175965; U.S. PATENT PUBLN. 2004/0029283;

ALTSCHUL ET AL., J. MOL. BIOL., 215:403-410, 1990.

AUSUBEL ET AL., IN: CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, JOHN, WILEY & SONS, INC, NEW YORK, 1998.

BABST ET AL., DEV. CELL, 3:271-282, 2002.

BEUTLER ET AL., N. ENGL. J. MED., 324(19):1370, 1991.

BEVAN ET AL., NATURE, 304:184-187, 1983.

BOTSTEIN ET AL., GENE, 8(1):17-24, 1979.

BRAKE ET AL., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 81(15):4642-4646, 1984.

BRUTLAG ET AL., COMPUTERS AND CHEMISTRY, 17:203-207, 1993.

CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, AUSUBEL ET AL. (EDS.), GREENE PUBLISHING AND WILEY-INTERSCIENCE, NY, 1989.

DALMAY ET AL., CELL, 101:543-553, 2000.

DELLAPORTA ET AL., IN: CHROMOSOME STRUCTURE AND FUNCTION: IMPACT OF NEW CONCEPTS, 18TH STADLER GENETICS SYMPOSIUM, 11:263-282, 1988.

DOW ET AL., J. EXP. BIOL., 200(P2):237-245, 1997.

DOW, J. BIOENERG. BIOMEMBR., 31(1):75-83, 1999.

ELBASHIR ET AL., GENES DEV., 5(2):188-200, 2001A.

ELBASHIR ET AL., EMBO J. 20: 6877-6888, 2001B.

- ELBASHIR ET AL., METHODS, 26:199-213, 2002.
- EUROPEAN APPLN. 0 120 516
- EUROPEAN APPLN. 0 122 791
- EUROPEAN APPLN. 0 127,328
- HAMILTON AND BAULCOMBE, SCIENCE, 286(5441):950-952, 1999.
- HANNON ET AL., J. MOL. NEUROSCI., 18(1-2):15-27, 2002.
- HAYMES ET AL., IN: NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH, IRL PRESS, WASHINGTON, DC, 1985.
- HERRERA-ESTRELLA ET AL., NATURE, 303:209-213, 1983.
- IKATU ET AL., BIO/TECHNOL., 8:241-242, 1990.
- JEFFERSON ET AL., EMBO J., 6:3901-3907, 1987A.
- JEFFERSON ET AL., PLANT MOL. BIOL. REP., 5:387-405, 1987B.
- KAEPLER ET AL., PLANT CELL REP., 8:415-418, 1990.
- KATZ ET AL., J. GEN. MICROBIOL., 129:2703-2714, 1983.
- KENNERDELL AND CARTHEW, CELL, 95:1017-1026, 1998.
- KENNERDELL AND CARTHEW, NAT. BIOTECHNOL., 18:896-898, 2000.
- KLEE ET AL., BIO-TECHNOLOGY, 3(7):637-642, 1985.
- LOVATO ET AL., INSECT MOL. BIOL., 10(4):333-340, 2001.
- LU ET AL., PHYTOCHEMISTRY, 53(8):941-946, 2000.
- MOURRAIN ET AL., CELL, 101:533, 2000.
- MYANOHARA ET AL., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 80(1):1-5, 1983.
- ODELL ET AL., NATURE, 313:810-812, 1985.

OGAS ET AL., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 96(24):13839-13844, 1999.

OMIRULLEH ET AL., PLANT MOL. BIOL., 21(3):415-428, 1993.

ORR-WEAVER ET AL., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 80(14):4417-4421, 1983.

PCT APPLN. WO 97/32016

PCT APPLN. WO 99/53050

PCT APPLN. WO 99/49029

PCT APPLN. WO 94/01550

PCT APPLN. WO 98/05770

PERAGINE ET AL, GENES DEV., 18(19):2368-2379, 2004.

PLEAU ET AL., ENTOMOL. EXP. APPL. 105:1-11, 2002.

PONTIUS ET AL., IN: UNIGENE: A UNIFIED VIEW OF THE TRANSCRIPTOME. NCBI HANDBOOK. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, BETHESDA, MD, 2003.

POTRYKUS ET AL., MOL. GEN. GENET., 199(2):169-177, 1985.

RAJAGOPAL ET. AL., J. BIOL. CHEM., 277:46849-46851, 2002.

RINE ET AL., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 80(22):6750-6754. 1983.

SAMBROOK ET AL., IN: MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ND ED., COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, COLD SPRING HARBOR, NY, 1989.

SCHNEPF ET AL., MICROBIOL. MOL. BIOL. REV., 62(3):775-806, 1998.

SMITH ET AL., CELL DEV. BIOL., 33:75-79; 1997.

STINCHCOMB ET AL., J. MOL. BIOL., 158(2):157-190, 1982.

SUTCLIFFE ET AL., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA,
75:3737-3741, 1978.

TABARA ET AL., SCIENCE, 282(5388):430-431, 1998.

TABASHNIK, APPL. ENVIRON. MICROBIOL., 58(10):3343-
3346, 1992.

VAN HEEKE AND SCHUSTER, J. BIOL. CHEM.,
264(33):19475-19477, 1989.

VAZQUEZ ET AL, MOL. CELL, 16(1):69-79, 2004.

YADAV ET AL., MOLEC. BIOCHEM. PARASITOL.,
DOI:10.1016/J.MOLBIOPARA.2006.03.013; IN PRESS, 2006.

ZUKOWSKY ET AL., PROC. NATL. ACAD. SCI. USA,
80:1101-1105, 1983.

REIVINDICAÇÕES

1. Construção de polinucleotídeo isolada, caracterizada pelo fato de que compreende 21 ou mais nucleotídeos contíguos de uma sequência de ácidos nucléico de SEQ ID NO: 818, SEQ ID NO: 822, SEQ ID NO:823, ou SEQ ID NO:824, operacionalmente ligados a um promotor heterólogo,

sendo que a ingestão, por coleóptero praga de plantas de uma sequência de ribonucleotídeo de fita dupla compreendendo pelo menos uma fita complementar aos referidos nucleotídeos contíguos, inibe a proliferação da referida praga.

2. Construção de polinucleotídeo isolada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:820.

3. Construção de polinucleotídeo isolada, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que está compreendida em um vetor de transformação de plantas.

4. Sequência de ribonucleotídeo de fita dupla, caracterizada pelo fato de que é produzida a partir da expressão de uma construção de polinucleotídeo como definida na reivindicação 1,

sendo que a ingestão da referida sequência do ribonucleotídeo, por um coleóptero praga de plantas, inibe a proliferação da referida praga, e

sendo que a sequência de ribonucleotídeo de fita dupla compreende pelo menos uma sequência que é complementar a 21 ou mais nucleotídeos contíguos da sequência de ácido nucleico de SEQ ID NO:818.

5. Sequência do ribonucleotídeo de fita dupla, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que é produzida pelo preparo de uma sequência recombinante de um polinucleotídeo, compreendendo uma primeira, uma segunda e uma terceira sequência

de polinucleotídeos,

sendo que a primeira sequência do polinucleotídeo compreende o polinucleotídeo, como definido na reivindicação 1, sendo que a terceira sequência do polinucleotídeo está ligada à primeira sequência do polinucleotídeo pela segunda sequência do polinucleotídeo, e

sendo que o terceiro polinucleotídeo é substancialmente o complemento reverso da primeira sequência do polinucleotídeo, de forma que a primeira e a terceira sequência do polinucleotídeo hibridizem, quando transcritas em um ácido ribonucléico, formam uma molécula de ribonucleotídeo de fita dupla estabilizada pela ligação da segunda sequência do ribonucleotídeo.

6. Sequência do ribonucleotídeo de fita dupla, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a ingestão da sequência do polinucleotídeo, pela praga, inibe a expressão de uma sequência de nucleotídeos substancialmente complementar à referida sequência do polinucleotídeo.

7. Microrganismo transgênico, caracterizado pelo fato de que é transformado com o polinucleotídeo, como definido na reivindicação 1.

8. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que é um microrganismo procariótico.

9. Método para controle de infestação por coleóptero praga, caracterizado pelo fato de que compreende o fornecimento, na dieta de um coleóptero praga, de um agente compreendendo uma primeira sequência de polinucleotídeo cujo modo de atuação, ao ser ingerido pela praga, é o de inibir uma função biológica no interior da referida praga,

sendo que a referida sequência do polinucleotídeo é complementar a 21 ou mais nucleotídeos contíguos da sequência de

ácido nucleico de SEQ ID NO:818, e é hibridizada a uma segunda sequência de polinucleotídeo complementar à referida primeira sequência de polinucleotídeo.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o referido coleóptero praga é um *Diabrotica spp*, selecionado do grupo que consiste em *Diabrotica virgifera*, *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica virgifera zea*, *Diabrotica balteata*, *Diabrotica barberi*, *Diabrotica viridula*, *Diabrotica speciosa* e *Diabrotica undecimpunctata*.

11. Método para controle de infestação por coleóptero praga, caracterizado pelo fato de que compreende:

o fornecimento na dieta de um coleóptero praga de uma célula de planta que expressa uma sequência de polinucleotídeo, como definido na reivindicação 1,

sendo que o polipeptídeo é expresso para produzir um ácido ribonucléico de fita dupla que atue na ingestão, pela praga, de modo a inibir a expressão de uma sequência-alvo dentro da referida praga, resultando em alimentação diminuída da referida dieta, em relação a uma dieta desprovida da célula da planta.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a praga exibe redução da proliferação após a ingestão da célula.

13. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a célula da planta compreende ainda uma sequência de polinucleotídeo que codifica um agente pesticida, selecionado do grupo que consiste em patatina, uma proteína inseticida produzida pelo *Bacillus thuringiensis*, proteína inseticida produzida pelo *Xenorhabdus*, proteína inseticida produzida pelo *Bacillus laterosporus* e uma proteína inseticida produzida pelo *Bacillus sphaericus*.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida proteína inseticida produzida pelo *Bacillus thuringiensis* é selecionada do grupo que consiste em Cry1, Cry3, TIC851, CryET70, Cry22, TIC901, TIC201, TIC407, TIC417, proteína inseticida binária CryET33 e CryET34, uma proteína inseticida binária CryET80 e CryET76, uma proteína inseticida binária TIC100 e TIC101, uma combinação das proteínas inseticidas ET29 ou ET37 com as proteínas inseticidas TIC810 ou TIC812 e uma proteína inseticida binária PS149B1.

15. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a sequência-alvo codifica uma proteína, cuja função prevista é ser uma subunidade do complexo de organização endossômica, exigido para transporte (ESCRT)-III.

16. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido coleóptero praga é um *Diabrotica spp.*, selecionado do grupo que consiste em *Diabrotica virgifera*, *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica virgifera zea*, *Diabrotica balteata*, *Diabrotica barberi*, *Diabrotica viridula*, *Diabrotica speciosa* e *Diabrotica undecimpunctata*.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o modo de atuação do polinucleotídeo, ao ser ingerido pela praga, é o de supressão de um gene que desempenhe uma função essencial para sobrevivência do inseto, a referida função sendo uma subunidade do complexo de organização endossômica, exigido para transporte (ESCRT)-III.

18. Método para melhorar o rendimento de cultivo de plantas de cultivo, sujeitas à infestação por inseto praga, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) introduzir um polinucleotídeo, como definido na reivindicação 1, na referida planta de grãos,

(b) cultivar a planta de cultivo de modo a permitir a expressão do referido polinucleotídeo, sendo que a expressão do polinucleotídeo inibe a alimentação pelos insetos praga e a perda de rendimento, decorrente de infestação pela praga.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a expressão do polinucleotídeo produz uma molécula de RNA que suprime, pelo menos, um primeiro gene-alvo em um inseto praga que ingeriu uma porção da referida planta de cultivo, sendo que o gene-alvo é uma subunidade do complexo de organização endossômica, exigido para transporte (ESCRT)-III.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o inseto praga é uma larva de *Diabrotica* spp de milho, selecionada do grupo que consiste em *Diabrotica undecimpunctata howardi* (SCR), *Diabrotica virgifera virgifera* (WCR), *Diabrotica barberi* (NCR), *Diabrotica virgifera zea* (MCR), *Diabrotica balteata* (BZR), *Diabrotica viridula* (BZR) e *Diabrotica speciosa* (BZR).

21. Método para melhorar a tolerância a estiagem de um cultivo resultante de uma planta de cultivo, sujeita a infestação por inseto praga, caracterizado pelo fato de que compreendendo as etapas de:

(a) introduzir um polinucleotídeo, como definido na reivindicação 1, na referida planta de cultivo,

(b) cultivar a planta de cultivo de modo a permitir a expressão do referido polinucleotídeo, sendo que a expressão do polinucleotídeo inibe a alimentação pelos insetos praga e a perda de tolerância à estiagem, decorrente de infestação pela praga.

22. Método para produção de um produto comercial, caracterizado pelo fato de que compreendendo a obtenção de uma planta compreendendo um polinucleotídeo, como definido na

reivindicação 1, ou parte da mesma, e o preparo de um produto comerciável a partir da planta ou parte da mesma.

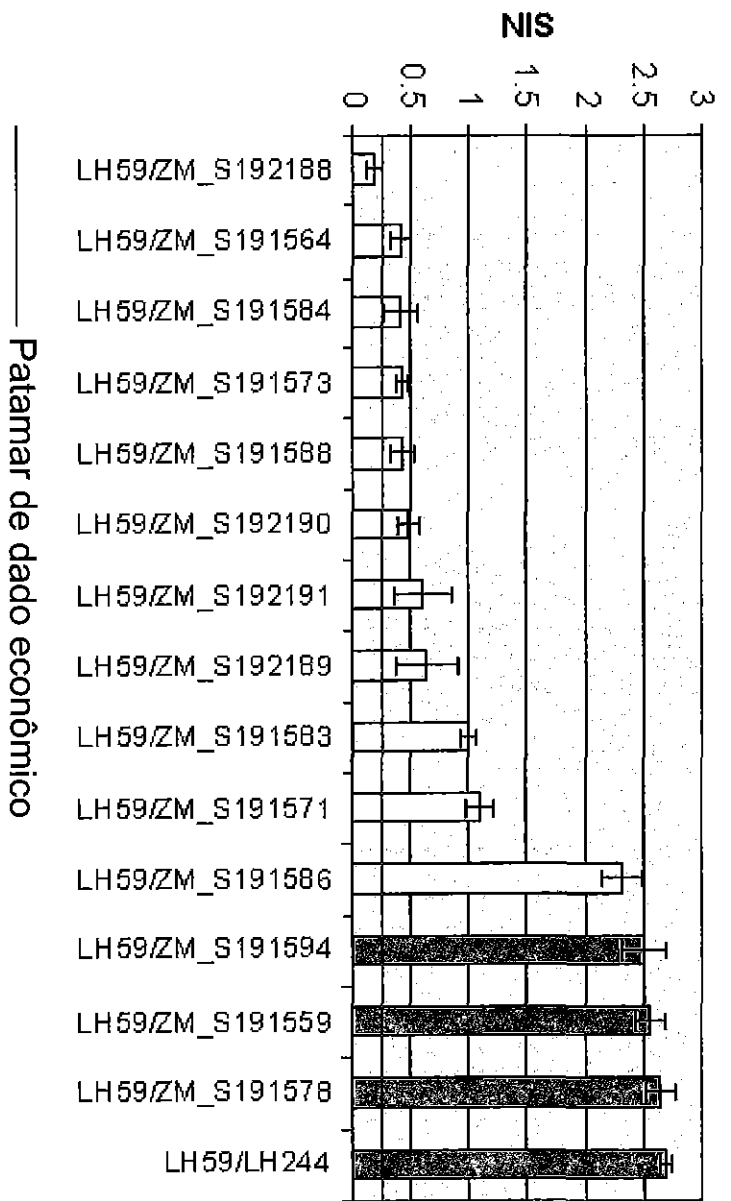
23. Método para produção de alimento ou ração, caracterizado pelo fato de que compreende a obtenção de uma planta compreendendo um polinucleotídeo, como definido na reivindicação 1, ou uma parte da mesma, e o preparo de alimento ou ração a partir da referida planta ou parte da mesma.

24. Método, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o alimento ou ração é definido como óleo, alimento, proteína, amido, farinha ou silagem.

922
820

FIG 1

DV49 (98503) Bioensaio de F1



923

FIG 2

C1 (98503) Bioensaio de F1

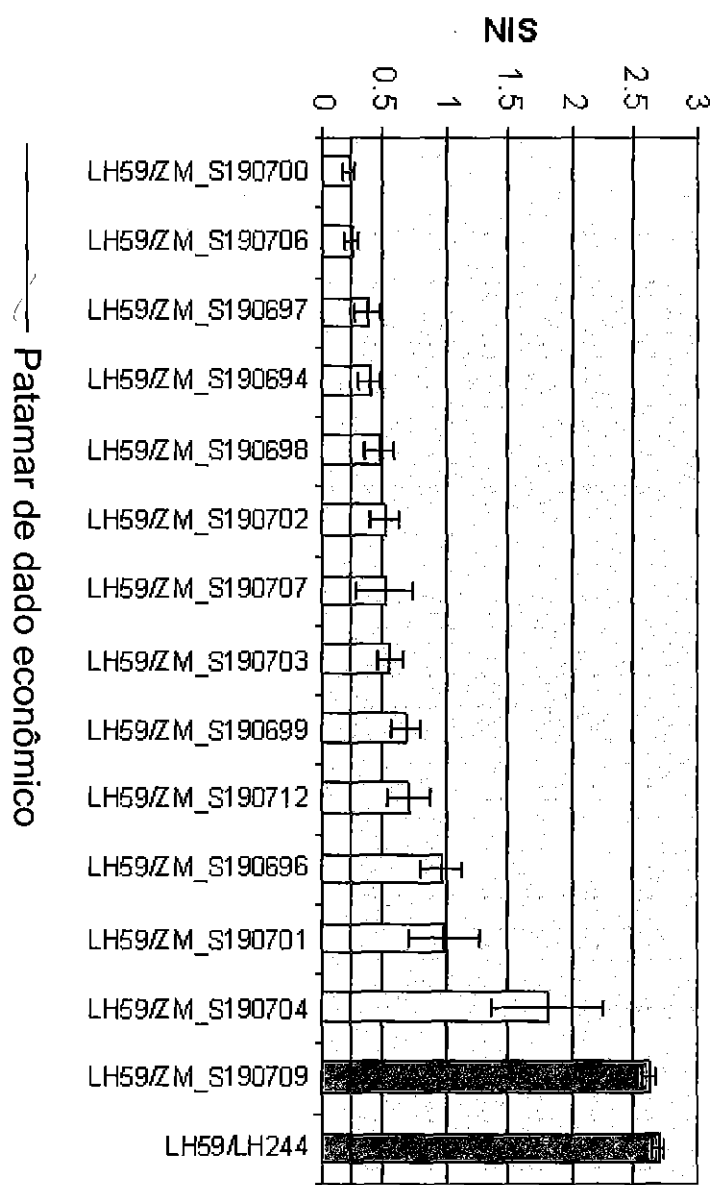
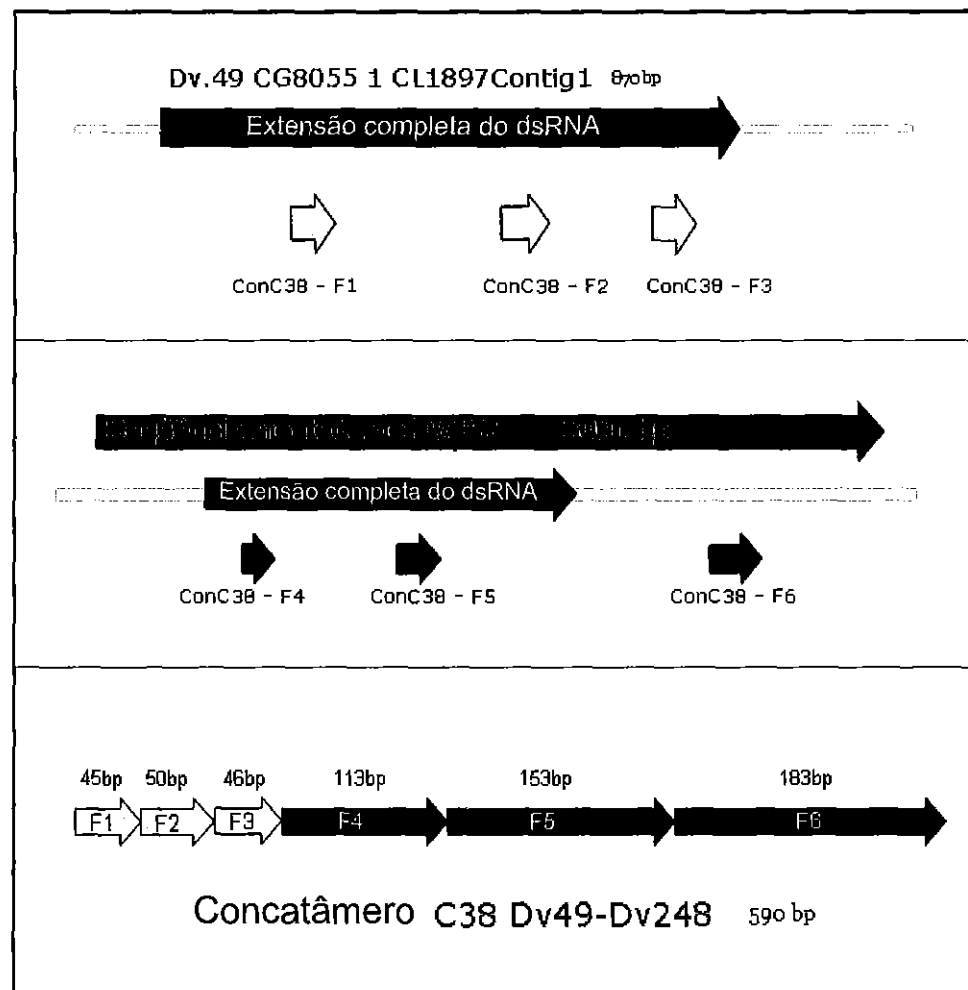


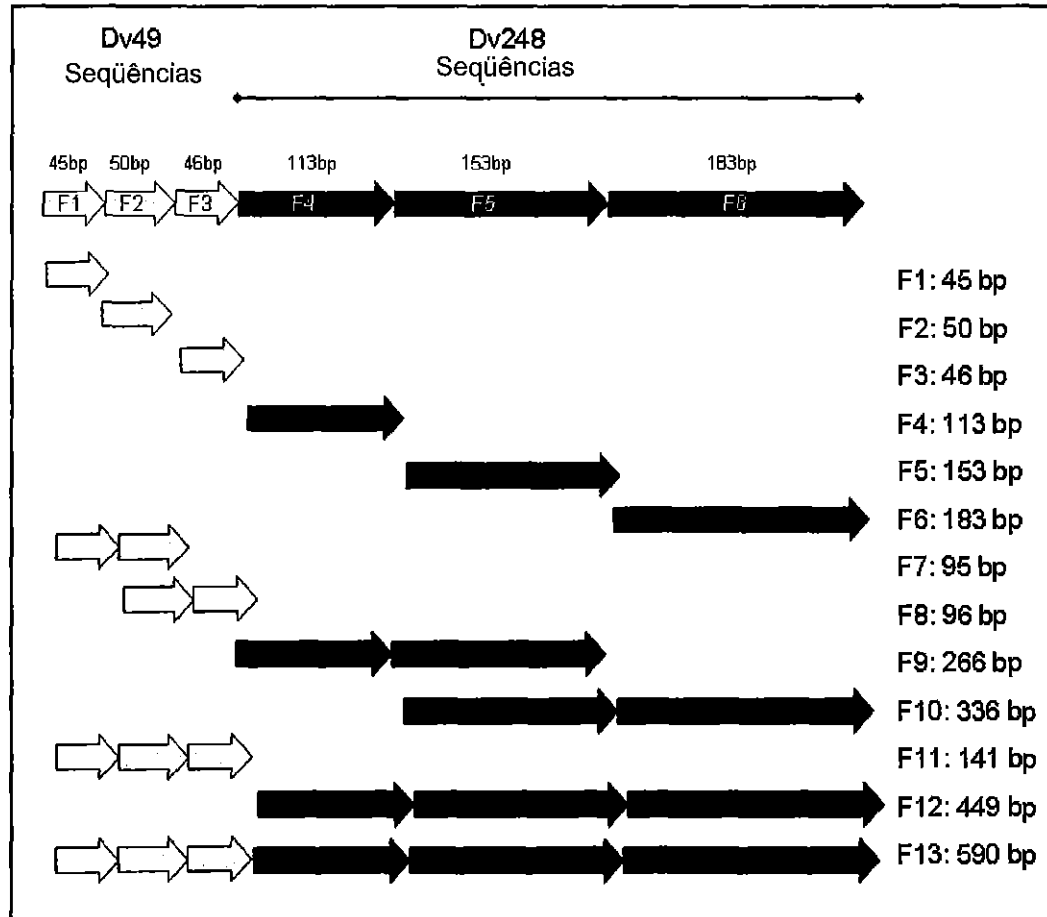
FIG 3



3/7

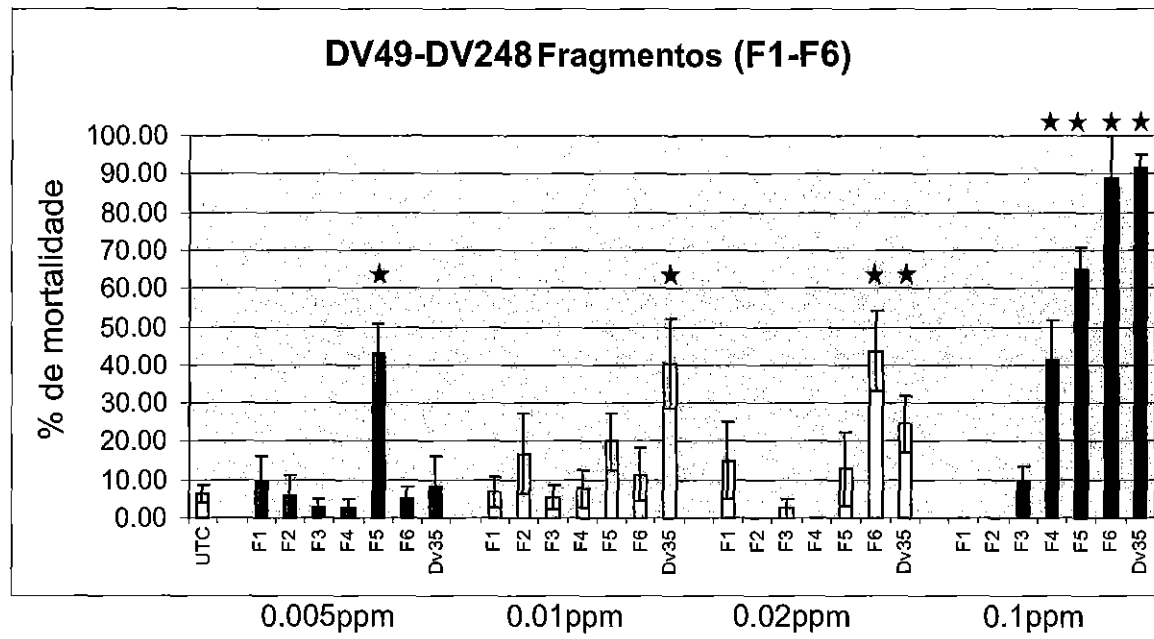
Handwritten marks and numbers at the bottom right corner.

FIG 4



0260

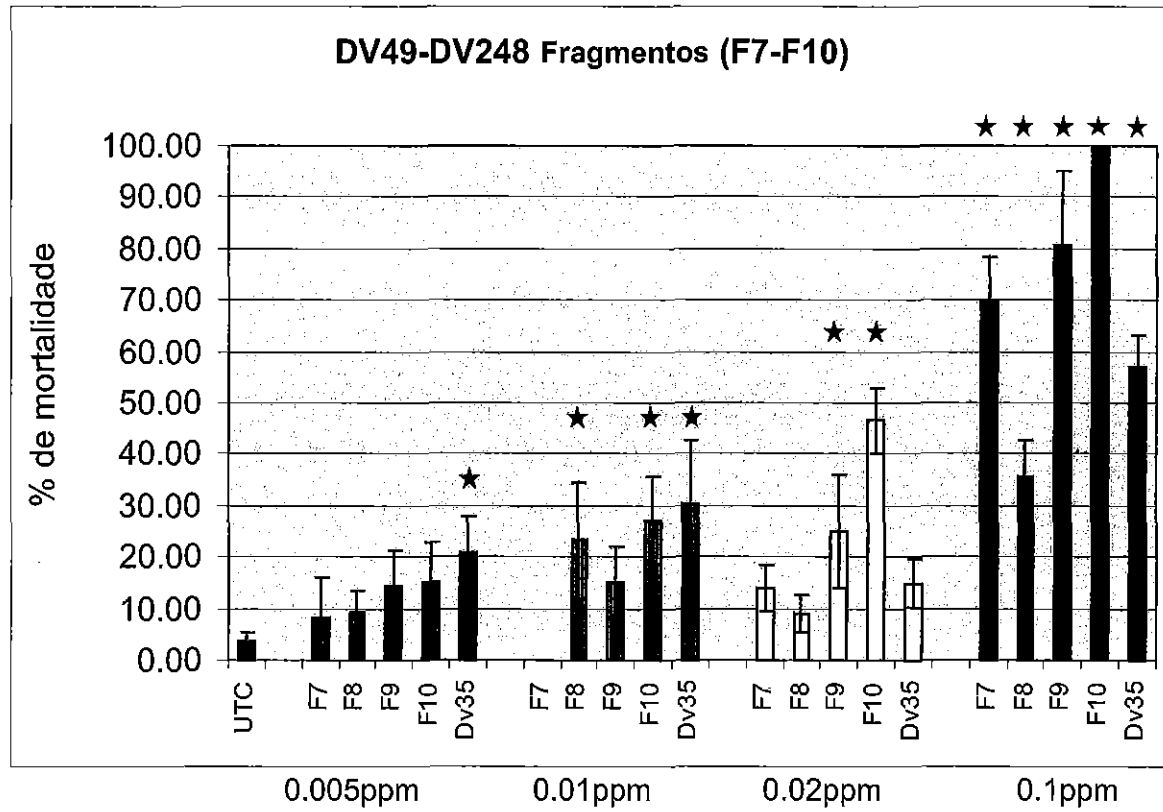
FIG 5



* Estatisticamente significativos

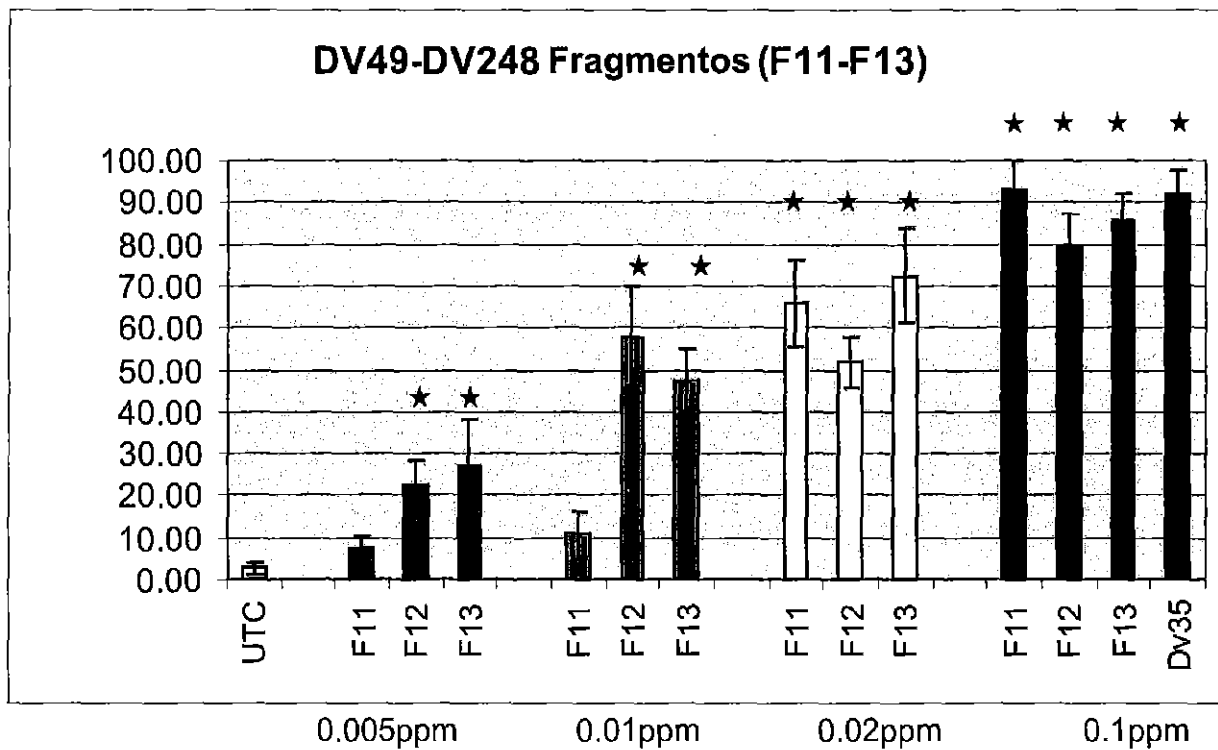
Handwritten marks/signatures at the bottom right corner.

FIG 6



★ Estatisticamente significativos

FIG 7



* Estatisticamente significativos

7/7

2020