



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

(21) PI 1107329-2 A2



* B R P I 1 1 0 7 3 2 9 A 2 *

(22) Data do Depósito: 30/12/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 19/11/2019

(54) Título: MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO QUE DIRECIONADAS À SUBUNIDADE H DE ATPASE VACUOLAR QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A PRAGAS DE COLEÓPTEROS, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTA, CÉLULA TRANSFORMADA, BEM COMO MÉTODOS PARA CONTROLAR UMA POPULAÇÃO DE PRAGA DE COLEÓPTERO, CONTROLAR UMA INFESTAÇÃO PELA DITA PRAGA, MELHORAR O RENDIMENTO DE UMA SAFRA E PARA PRODUZIR UMA CÉLULA TRANSGÊNICA

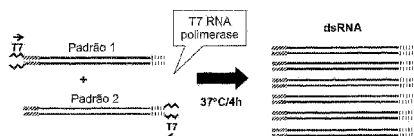
(51) Int. Cl.: C12N 15/11; C12N 15/113; C12N 15/82; A01H 5/00.

(30) Prioridade Unionista: 30/12/2010 US 61/428,619.

(71) Depositante(es): DOW AGROSCIENCES LLC.

(72) Inventor(es): CHAOXIAN GENG; IGNACIO LARRINUA; KENNETH E. NARVA; HUARONG LI; MONICA BRITT OLSON; NAVIN ELANGO.

(57) Resumo: Patente de Invenção: "MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO QUE DIRECIONADAS À SUBUNIDADE H DE ATPASE VACUOLAR QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A PRAGAS DE COLEÓPTEROS, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTA, CÉLULA TRANSFORMADA, BEM COMO MÉTODOS PARA CONTROLAR UMA POPULAÇÃO DE PRAGA DE COLEÓPTERO, CONTROLAR UMA INFESTAÇÃO PELA DITA PRAGA, MELHORAR O RENDIMENTO DE UMA SAFRA E PARA PRODUZIR UMA CÉLULA TRANSGÊNICA". A invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico e métodos de uso destas para o controle de pragas de coleópteros através de inibição mediada por interferência de RNA de sequências de codificação e que não de codificação transcritas alvos em pragas de coleópteros. A invenção também refere-se a métodos para fabricar plantas transgênicas que expressam moléculas de ácido nucleico úteis para o controle de pragas de coleópteros, e as células de plantas e plantas obtidas deste modo.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MO-LÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEÍCO QUE DIRECIONADAS À SUBUNIDADE H DE ATPASE VACUOLAR QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A PRAGAS DE COLEÓPTEROS, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTA, CÉLULA TRANSFORMADA, BEM COMO MÉTODOS PARA CONTROLAR UMA POPULAÇÃO DE PRAGA DE COLEÓPTERO, CONTROLAR UMA INFESTAÇÃO PELA DITA PRAGA, MELHORAR O RENDIMENTO DE UMA SAFRA E PARA PRODUZIR UMA CÉLULA TRANSGÊNICA".**

CAMPO DA DIVULGAÇÃO

[001] A presente invenção geralmente refere-se ao controle genético de dano à planta causado por pragas de coleópteros. Em modalidades particulares, a presente invenção refere-se à identificação de sequências de codificação e que não de codificação alvos, e ao uso de tecnologias de DNA recombinante para pós-transcricionalmente reprimir ou inibir a expressão de sequências de codificação e que não de codificação alvos nas células de uma praga de coleóptero para fornecer um efeito protetivo à planta.

ANTECEDENTES

[002] O crisomelídeo do milho ocidental (WCR), *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, é uma das espécies de crisomelídeo do milho mais devastadoras na América do Norte e é uma preocupação particular em áreas de cultivo do milho da Região Centro-Oeste dos Estados Unidos. O crisomelídeo do milho do norte (NCR), *Diabrotica barberi* Smith e Lawrence, é uma espécie intimamente relacionada que coabita em grande quantidade da mesma faixa como WCR. Existem várias outras subespécies relacionadas de *Diabrotica* que são pragas significantes na América do Norte: o crisomelídeo do milho mexicano (MCR), *D. virgifera zea* Krysan e Smith; o crisomelídeo do milho do sul (SCR), *D. undecimpunctata howardi* Barber; *D. balteata* LeConte; *D.*

undecimpunctata tenella; e *D. u. undecimpunctata* Mannerheim. The United States Department of Agriculture correntemente estima que crismelídeos do milho causam 1 bilhão de dólares em receitas perdidas todo ano, incluindo 800 milhões de dólares em perda de rendimento e 200 milhões de dólares em custos de tratamento.

[003] Tanto WCR quanto NCR são depositados no solo como ovos durante o verão. Os insetos permanecem na fase de ovo por todo o inverno. Os ovos são oblongos, brancos, e menos do que 0,004 polegada (0,01 cm) em comprimento. As larvas saem do ovo no fim de maio ou início de junho, com o momento exato de saída do ovo variando de ano a ano devido a diferenças de temperatura e local. As larvas recentemente saídas do ovo são vermes brancos que são menos do que 0,125 polegada (0,3 cm) em comprimento. Uma vez saídas do ovo, as larvas começam a alimentar-se de raízes do milho. Crismelídeos do milho passam por três instares larvais. Depois de se alimentar por várias semanas, as larvas mudam na fase pupal. Elas entram em estado de pupa no solo, e depois elas emergem do solo como adultos em julho e agosto. Crismelídeos adultos são cerca de 0,25 polegada (0,6 cm) em comprimento.

[004] Larvas de crismelídeo do milho completam o desenvolvimento no milho e várias outras espécies de gramíneas. Larvas cultivadas em rabo de raposa amarelo emergem mais tarde e têm um tamanho de cápsula cefálica menor como adultos do que larvas cultivadas no milho. Ellsbury *et al.* (2005) Environ. Entomol. 34:627-34. Adultos de WCR alimentam-se de seda, pólen, e sementes de milho de pontas de espiga expostas. Se adultos de WCR emergem antes que tecidos reprodutivos do milho estejam presentes, eles podem alimentar-se de tecido foliar, deste modo reduzindo o crescimento da planta e ocasionalmente matando a planta hospedeira. Entretanto, os adultos deslocarão rapidamente para sedas e pólen preferidos quando eles tornam-

se disponíveis. Adultos de NCR também alimentam-se de tecidos reprodutivos da planta do milho, mas ao contrário raramente alimentam-se de folhas do milho.

[005] A maioria do dano por crisomelídeo no milho é causada por alimentação larval. Crisomelídeos recentemente saídos do ovo inicialmente alimentam-se de pelos radiculares de milho finos e escondem-se nas pontas das raízes. Conforme as larvas crescem mais, elas alimentam-se de e escondem-se em raízes primárias. Quando crisomelídeos do milho são abundantes, a alimentação larval frequentemente resulta na poda das raízes inteiramente até a base do talo de milho. O dano severo à raiz interfere com a capacidade das raízes para transportar água e nutrientes na planta, reduz o crescimento da planta, e resulta na produção de grão reduzida, deste modo frequentemente reduzindo drasticamente o rendimento global. O dano severo à raiz também frequentemente resulta em acomodação de plantas do milho, o que torna a colheita mais difícil e diminui ainda mais o rendimento. Além disso, a alimentação por adultos nos tecidos reprodutivos do milho pode resultar na poda de sedas na ponta da espiga. Se este "corte da seda" for severo o bastante durante o espalhamento do pólen, a polinização pode ser interrompida.

[006] O controle dos crisomelídeos do milho pode ser obtido por rotação de culturas, inseticidas químicos, biopesticidas (por exemplo, a bactéria gram-positiva de formação de esporo, *Bacillus thuringiensis*), ou uma combinação destes. A rotação de culturas sofre da desvantagem significativa de colocar restrições indesejadas no uso da terra agrícola. Além disso, a oviposição de algumas espécies de crisomelídeo pode ocorrer em campos de soja, deste modo mitigando a efetividade da rotação de culturas praticada com milho e soja.

[007] Inseticidas químicos são os que mais expressivamente contaram com a estratégia para obter controle do crisomelídeo do milho.

O uso de inseticida químico, entretanto, é uma estratégia de controle do crisomélídeo do milho imperfeita; mais de 1 bilhão de dólares podem ser perdidos nos Estados Unidos todo ano devido ao crisomélídeo do milho quando os custos dos inseticidas químicos são adicionados aos custos do dano por crisomélídeo que podem ocorrer apesar do uso dos inseticidas. Populações altas de larvas, chuvas fortes, e aplicação imprópria do(s) inseticida(s) podem todas resultar em controle do crisomélídeo do milho inadequado. Além disso, o uso contínuo de inseticidas pode selecionar quanto a cepas de crisomélídeo resistente a inseticida, assim como elevar preocupações ambientais significantes devido à toxicidade de muitos deles a espécies não alvos.

[008] Interferência de RNA (RNAi) é um processo utilizando vias celulares endógenas, por meio das quais uma molécula de RNA interferente (iRNA) (por exemplo, uma molécula de dsRNA) que é específica para todas, ou qualquer porção de tamanho adequado, de uma sequência de gene alvo resulta na degradação do mRNA codificado deste modo. Em anos recentes, RNAi foi usado para realizar o "knock-down" de genes em várias espécies e sistemas experimentais; por exemplo, *C. elegans*, plantas, embriões de insetos, e células em cultura tecidual. Ver, por exemplo, Fire *et al.* (1998) *Nature* 391:806-11; Martinez *et al.* (2002) *Cell* 110:563-74; McManus e Sharp (2002) *Nature Rev. Genetics* 3:737-47.

[009] RNAi realiza a degradação de mRNA através de uma via endógena incluindo o complexo de proteína DICER. DICER cliva moléculas de dsRNA longas em fragmentos curtos de aproximadamente 20 nucleotídeos, denominados RNA interferente pequeno (siRNA). O siRNA é desenrolado em dois RNAs de fita única: a fita de passagem e a fita de guia. A fita de passagem é degradada, e a fita de guia é incorporada no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Moléculas de ácido ribonucleico microinibitório (miRNA) podem ser

similarmenete incorporadas em RISC. O silenciamento de gene pós-transcricional ocorre quando a fita de guia liga-se especificamente a uma sequência complementar de uma molécula de mRNA e induz a clivagem por Argonaute, o componente catalítico do complexo de RISC. Este processo é conhecido difundir sistemicamente por todo o organismo apesar de concentrações inicialmente limitadas de siRNA e/ou miRNA em alguns eucariotas tais como plantas, nematódeos, e alguns insetos.

[0010] Apenas transcritos complementares ao siRNA e/ou miRNA são clivados e degradados, e assim o knockdown da expressão de mRNA é específico de sequência. Em plantas, vários grupos funcionais de genes de DICER existem. O efeito de silenciamento de gene de RNAi persiste por dias e, sob condições experimentais, pode levar a um declínio em abundância do transcrito alvejado de 90% ou mais, com a redução consequente em níveis da proteína correspondente.

[0011] Patente U.S. 7.612.194 e Publicação de Patentes U.S. Nos. US 2007/0050860, US 2010/0192265, e US 2011/0154545 divulgam uma biblioteca de 9112 sequências de marcador de sequência expressada (EST) isoladas de pupas de *D. v. virgifera* LeConte. É sugerido na Patente U.S. 7.612.194 e Publicação de Patente U.S. Nº US 2007/0050860 ligar operavelmente a um promotor uma molécula de ácido nucleico que é complementar a uma de várias sequências parciais particulares de H⁺-ATPase do tipo vacuolar (V-ATPase) de *D. v. virgifera* divulgadas nesta para a expressão de RNA antissenso em células de plantas. A Publicação de Patente U.S. Nº US 2010/0192265 sugere operavelmente ligar um promotor a uma molécula de ácido nucleico que é complementar a uma sequência parcial particular de um gene de *D. v. virgifera* de função desconhecida e não divulgada (a sequência parcial é estabelecida ser 58 % idêntica ao produto de gene C56C10.3 em *C. elegans*) para a expressão de RNA antissenso em

células de plantas. A Publicação de Patente U.S. Nº US 2011/0154545 sugere operavelmente ligar um promotor a uma molécula de ácido nucleico que é complementar a duas sequências parciais particulares de genes de subunidade beta de coatomer de *D. v. virgifera* para a expressão de RNA antissenso em células de plantas. Além disso, a Patente U.S. 7.943.819 divulga uma biblioteca de 906 sequências de marcador de sequência expressada (EST) isoladas de larvas, pupas, e planas anãs dissecadas de *D. v. virgifera* LeConte, e sugere operavelmente ligar um promotor a uma molécula de ácido nucleico que é complementar a uma sequência parcial particular de um gene 4b de proteína corporal multivesicular carregado de *D. v. virgifera* para a expressão de RNA de fita dupla em células de plantas.

[0012] Nenhuma outra sugestão é fornecida na Patente U.S. 7.612.194, e Publicação de Patentes U.S. Nos. US 2007/0050860, US 2010/0192265 e US 2011/0154545 para usar qualquer sequência particular de mais do que as nove mil sequências listadas nesta para interferência de RNA, exceto as várias sequências parciais particulares de V-ATPase e as sequências parciais particulares de genes de função desconhecida. Além disso, nenhuma da Patente U.S. 7.612.194, e Publicação de Patentes U.S. Nºs. US 2007/0050860 e US 2010/0192265, e US 2011/0154545 fornece qualquer orientação como a qual outra das mais de nove mil sequências fornecidas seria letal, ou ainda de outro modo útil, em espécies de crisomelídeo do milho quando usadas como dsRNA ou siRNA. A Patente U.S. 7.943.819 não fornece nenhuma sugestão para usar qualquer sequência particular das mais do que novecentas sequências listadas nesta para interferência de RNA, exceto a sequência parcial particular de um gene 4b de proteína corporal multivesicular carregado. Além disso, a Patente U.S. 7.943.819 não fornece nenhuma orientação como a qual outra das mais de novecentas sequências fornecidas seria letal, ou ainda de outro modo útil,

em espécies de crisomelídeo do milho quando usadas como dsRNA ou siRNA.

[0013] A maioria esmagadora de sequências complementares a DNAs de crisomelídeo do milho (tal como o precedente) não são letais em espécies de crisomelídeo do milho quando usadas como dsRNA ou siRNA. Por exemplo, Baum *et al.* (2007), descrevem os efeitos de inibir vários alvos de gene de WCR por RNAi. Estes autores relataram que os 8 de 26 genes alvos que eles testaram não foram capazes de fornecer mortalidade de praga de coleóptero experimentalmente significativa em uma concentração de iRNA muito alta (por exemplo, dsRNA) de mais do que 520 ng/cm².

SUMÁRIO DA DIVULGAÇÃO

[0014] Divulgadas aqui são moléculas de ácido nucleico (por exemplo, genes alvos, DNAs, dsRNAs, siRNAs, miRNAs, e hpRNAs), e métodos de uso destes, para o controle de pragas de coleópteros, incluindo, por exemplo, *D. v. virgifera* LeConte (crisomelídeo do milho ocidental, "WCR"); *D. barberi* Smith e Lawrence (crisomelídeo do milho do norte, "NCR"); *D. u. howardi* Barber (crisomelídeo do milho do sul, "SCR"); *D. v. zea* Krysan e Smith (crisomelídeo do milho mexicano, "MCR"); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; e *D. u. undecimpunctata* Mannerheim. Em exemplos particulares, moléculas de ácido nucleico exemplares são divulgadas que podem ser homólogas o pelo menos uma porção de uma ou mais sequências de ácido nucleico nativas em uma praga de coleóptero.

[0015] Nestes e outros exemplos, a sequência de ácido nucleico nativa pode ser um gene alvo, o produto do qual pode ser, por exemplo e sem limitação: envolvido em um processo metabólico; envolvido em um processo reprodutivo; ou envolvido em desenvolvimento larval. Em alguns exemplos, a inibição pós-traducional da expressão de um gene alvo por uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma

sequência homóloga a esta pode ser letal em pragas de coleópteros, ou resultar em crescimento e/ou reprodução reduzidos. Em exemplos específicos, pelo menos um gene selecionado da lista consistindo em D_vir_c1319_VatpaseH; D_vir_c47185_Caf1180; D_vir_c1229_VatpaseC; e Contig_01_Rho1_1-191_CDC42 pode ser selecionado como um gene alvo para silenciamento pós-transcricional. Em exemplos particulares, um gene alvo útil para a inibição pós-traducional é uma subunidade H de ATPase vacuolar compreendendo uma sequência de nucleotídeo referida aqui como D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3), ou um homólogo desta. Moléculas de ácido nucleico isoladas compreendendo a sequência de D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3), seu complemento, e certos novos fragmentos de cada são portanto divulgadas aqui.

[0016] Também divulgadas são moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo que é pelo menos 85% idêntico a uma sequência de aminoácido dentro de um produto de gene alvo (por exemplo, o produto de um gene selecionado do grupo consistindo em D_vir_c1319_VatpaseH; D_vir_c1229_VatpaseC; D_vir_c47185_Caf1180; e Contig_01_Rho1_1-191_CDC42). Em exemplos particulares, uma molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo que é pelo menos 85 % idêntico a uma sequência de aminoácido dentro de um polipeptídeo codificado por um gene de subunidade H de ATPase vacuolar compreendendo uma sequência de nucleotídeo referida aqui como D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3), ou um homólogo desta. Ainda divulgadas são moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo que é o complemento reverso de uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo pelo menos 85% idêntico a uma sequência de aminoácido dentro de um produto de gene alvo.

[0017] Também divulgadas são sequências de cDNA que podem ser usadas para a produção de moléculas de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) que são complementares a todo ou parte de um gene alvo de praga de coleóptero, por exemplo: D_vir_c1319_VatpaseH; D_vir_c1229_VatpaseC; D_vir_c47185_Caf1180; e/ou Contig_01_Rho1_1-191_CDC42. Em modalidades particulares, dsRNAs, siRNAs, miRNAs, e/ou hpRNAs podem ser produzidos *in vitro*, ou *in vivo* por um organismo geneticamente modificado, tal como uma planta ou bactéria. Em exemplos particulares, moléculas de cDNA são divulgadas que podem ser usadas para produzir moléculas de iRNA que são complementares a D_vir_c1319_VatpaseH, ou certos novos fragmentos destas.

[0018] Ainda divulgados são meios para inibir a expressão de um gene essencial em uma praga de coleóptero, e meios para fornecer resistência à praga de coleóptero a uma planta. Um meio para inibir a expressão de um gene essencial em uma praga de coleóptero é uma molécula de RNA de fita única ou dupla consistindo em qualquer uma das SEQ ID NOs: 7, 8, 10, 11, 49, 50, 86, 87, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 127, 128, 129, 130, 131, ou o complemento destas. Um meio para fornecer resistência à praga de coleóptero a uma planta é uma molécula de DNA compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica um meio para inibir a expressão de um gene essencial em uma praga de coleóptero operavelmente ligada a um promotor, em que a molécula de DNA é capaz de ser integrada no genoma de uma planta de milho.

[0019] Divulgados são métodos para controlar uma população de uma praga de coleóptero, compreendendo fornecer a uma praga de coleóptero uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) que funciona em ser absorvida pela praga de coleópte-

ro para inibir uma função biológica dentro da praga de coleóptero, em que a molécula de iRNA compreende toda ou parte de uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 1; o complemento da SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; o complemento da SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; o complemento da SEQ ID NO: 4; uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* (por exemplo, WCR) compreendendo todas ou parte de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 4; o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo todas ou parte de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 4; uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo todas ou parte de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 4; e o complemento de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo todas ou parte de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 4.

[0020] Em exemplos particulares, métodos são divulgados para controlar uma população de uma praga de coleóptero, compreendendo fornecer a uma praga de coleóptero uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) que funciona em ser absorvida pela praga de coleóptero para inibir uma função biológica dentro da praga de coleóptero, em que a molécula de iRNA compreende uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: toda ou parte da SEQ ID NO: 1; o complemento de toda ou parte da SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; o complemento da SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 4; o complemento da SEQ ID NO: 4; toda ou parte da SEQ ID NO: 9; todo ou parte do complemento da SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; o complemento da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; o complemento da SEQ ID NO: 11;

toda ou parte de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 1; todo ou parte do complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 1; toda ou parte de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 1; e todo ou parte do complemento de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 1.

[0021] Também divulgados aqui são métodos em que dsRNAs, siRNAs, miRNAs, e/ou hpRNAs podem ser fornecidos a uma praga de coleóptero em um ensaio com base em dieta, ou em células de plantas geneticamente modificadas expressando os dsRNAs, siRNAs, miRNAs, e/ou hpRNAs. Nestes e outros exemplos, os dsRNAs, siRNAs, miRNAs, e/ou hpRNAs podem ser ingeridos por larvas de praga de coleóptero. A ingestão de dsRNAs, siRNA, miRNAs, e/ou hpRNAs da invenção depois pode resultar em RNAi nas larvas, que por sua vez pode resultar no silenciamento de um gene essencial para a viabilidade da praga de coleóptero e levando em fim a mortalidade larval. Assim, métodos são divulgados em que moléculas de ácido nucleico compreendendo sequência(s) de ácido nucleico exemplar(es) útil(eis) para o controle de pragas de coleópteros são fornecidas a uma praga de coleóptero. Em exemplos particulares, a praga de coleóptero controlada pelo uso de moléculas de ácido nucleico da invenção pode ser WCR ou NCR.

[0022] As características precedentes e adicionais tornar-se-ão mais evidentes a partir da Descrição Detalhada seguinte de várias modalidades, que procede com referência às Figuras anexas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0023] A figura 1 inclui uma representação da estratégia usada para fornecer padrões específicos para a produção de dsRNA.

[0024] A figura 2 inclui um gráfico de variabilidade para a inibição do crescimento de pragas de coleópteros tratadas com moléculas de ácido nucleico exemplares.

[0025] A figura 3 inclui um gráfico de variabilidade para a mortalidade de pragas de coleópteros tratadas com moléculas de ácido nucleico exemplares.

[0026] A figura 4 inclui um outro gráfico de variabilidade para a inibição do crescimento de pragas de coleópteros tratadas com moléculas de ácido nucleico exemplares.

[0027] A figura 5 inclui uma representação em cartum de várias sequências de nucleotídeo que podem estar presentes em certas moléculas de ácido nucleico da invenção. Onde indicado, "(sequência)," refere-se a uma região da sequência de nucleotídeo representada tendo qualquer comprimento e sequência particular, por exemplo e sem limitação, um segmento contíguo de uma das SEQ ID NOs: 1 a 4. Regiões *escritas em itálico* das sequências de nucleotídeo representadas são opcionais.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

[0028] As sequências de ácido nucleico listadas na listagem de sequência anexa são mostradas usando abreviações por letra padrão para bases de nucleotídeo, como definido em 37 C.F.R. § 1.822. Apenas um filamento de cada sequência de ácido nucleico é mostrado, mas a fita complementar e fita complementar reversa são entendidas como incluídas por qualquer referência à fita exibida. Na listagem de sequência anexa:

[0029] A SEQ ID NO: 1 mostra uma sequência de cDNA de *Dia-brotica* exemplar, referida em alguns lugares como D_vir_c47185_Caf1180, ou Caf1-180.

[0030] A SEQ ID NO: 2 mostra uma sequência de cDNA de *Dia-brotica* exemplar, referida em alguns lugares como D_vir_c1229_VatpaseC, ou VatpaseC.

[0031] A SEQ ID NO: 3 mostra uma sequência de cDNA de *Dia-brotica* exemplar, referida em alguns lugares como D_vir_c1319_VatpaseH, ou VatpaseH.

[0032] A SEQ ID NO: 4 mostra uma sequência de cDNA de *Dia-brotica* exemplar, referida em alguns lugares como Con-tig_01_Rho1_1-191_CDC42, ou Rho1.

[0033] As SEQ ID NOs: 5 a 8 mostram fragmentos não contíguos exemplares de um cDNA de subunidade C de ATPase vacuolar de *Di-abrotica*.

[0034] As SEQ ID NOs: 9 a 11 mostram fragmentos não contíguos exemplares de um cDNA de subunidade H de ATPase vacuolar de *Di-abrotica*.

[0035] A SEQ ID NO: 12 mostra uma sequência promotora de fago T7.

[0036] As SEQ ID NOs: 13 a 38 mostram iniciadores usados para ampliar porções de regiões de codificação de genes alvos exemplares por PCR.

[0037] As SEQ ID NOs: 39 a 48 mostram iniciadores usados para ampliar regiões de gene de Caf1-180 e VatpaseC para a síntese de RNA do tipo grampo de cabelo.

[0038] A SEQ ID NO: 49 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de Caf1-180 contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 1 que contém uma sequência de consenso de milho.

[0039] A SEQ ID NO: 50 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de VatpaseC contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de

hpRNA de versão 1 que contém uma sequência de consenso de milho.

[0040] A SEQ ID NO: 51 mostra uma sequência de DNA da região 1 de anexina.

[0041] A SEQ ID NO: 52 mostra uma sequência de DNA da região 2 de anexina.

[0042] A SEQ ID NO: 53 mostra uma sequência de DNA da região 1 de beta espectrina 2.

[0043] A SEQ ID NO: 54 mostra uma sequência de DNA da região 2 de beta espectrina 2.

[0044] A SEQ ID NO: 55 mostra uma sequência de DNA da região 1 de mtRP-L4.

[0045] A SEQ ID NO: 56 mostra uma sequência de DNA da região 2 de mtRP-L4.

[0046] A SEQ ID NO: 57 mostra uma sequência de DNA que codifica um YFP.

[0047] As SEQ ID NOs: 58 a 85 mostram iniciadores usados para ampliar regiões de gene de anexina, beta espectrina 2, mtRP-L4, e YFP para a síntese de dsRNA.

[0048] A SEQ ID NO: 86 mostra um fragmento ampliado de 260 pb exemplar de um cDNA de D_vir_c47185_Caf1-180 que foi usado como um padrão para a síntese de uma molécula de dsRNA.

[0049] As SEQ ID NOs: 87 a 90 mostram fragmentos não contíguos exemplares de um cDNA de Rho1 de *Diabrotica*.

[0050] A SEQ ID NO: 91 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de Caf1-180 exemplar contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136), incluindo um sítio de clonagem opcional flanqueando o íntron, para um vetor de expressão de versão 1 que contém uma sequência de consenso de milho.

[0051] A SEQ ID NO: 92 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de Caf1-180 exemplar contendo

um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 2 que não contém a sequência de consenso de milho.

[0052] A SEQ ID NO: 93 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de VatpaseC exemplar contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136), incluindo um sítio de clonagem opcional flanqueando o íntron, para um vetor de expressão de hpRNA de versão 1 que contém uma sequência de consenso de milho.

[0053] A SEQ ID NO: 94 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de VatpaseC exemplar contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de hpRNA de versão 2 que não contém a sequência de consenso de milho.

[0054] A SEQ ID NO: 95 mostra um segmento exemplar de um filamento senso de DNA de Caf1-180 contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 3.

[0055] A SEQ ID NO: 96 mostra um segmento exemplar de um filamento antissenso de DNA de Caf1-180 para um vetor de expressão de versão 3.

[0056] A SEQ ID NO: 97 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de Caf1-180 exemplar contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 3.

[0057] A SEQ ID NO: 98 mostra um segmento exemplar de um filamento senso de DNA de VatpaseC contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 3.

[0058] A SEQ ID NO: 99 mostra um segmento exemplar de um filamento antissenso de DNA de VatpaseC para um vetor de expressão de versão 3.

[0059] A SEQ ID NO: 100 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de VatpaseC exemplar con-

tendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 3.

[0060] A SEQ ID NO: 101 mostra um segmento exemplar de um filamento senso de DNA de VatpaseC contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 4.

[0061] A SEQ ID NO: 102 mostra um segmento exemplar de um filamento antissenso de DNA de VatpaseC para um vetor de expressão de versão 4.

[0062] A SEQ ID NO: 103 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de VatpaseC exemplar contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 4.

[0063] A SEQ ID NO: 104 mostra um segmento exemplar de um filamento senso de DNA de VatpaseH contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 1.

[0064] A SEQ ID NO: 105 mostra um segmento exemplar de um filamento antissenso de DNA de VatpaseH para um vetor de expressão de versão 1.

[0065] A SEQ ID NO: 106 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de VatpaseH exemplar contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 1.

[0066] A SEQ ID NO: 107 mostra um segmento exemplar de um filamento senso de DNA de Rho1 contendo um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 1.

[0067] A SEQ ID NO: 108 mostra um segmento exemplar de um filamento antissenso de DNA de Rho1 para um vetor de expressão de versão 1.

[0068] A SEQ ID NO: 109 mostra uma sequência de DNA de formação de RNA do tipo grampo de cabelo de Rho1 exemplar contendo

um íntron de ST-LS1 (SEQ ID NO: 136) para um vetor de expressão de versão 1.

[0069] A SEQ ID NO: 110 mostra um segmento exemplar de um DNA de Caf-180 usado para fornecer um padrão para a síntese de dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0070] A SEQ ID NO: 111 mostra um segmento exemplar de um DNA de região 1 de VatpaseC usado para fornecer um padrão para a síntese de dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0071] A SEQ ID NO: 112 mostra um segmento exemplar de um DNA de região 1 (curto) de VatpaseC usado para fornecer um padrão para a síntese de dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0072] A SEQ ID NO: 113 mostra um segmento exemplar de um DNA de região 2 de VatpaseC usado para fornecer um padrão para a síntese de dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0073] A SEQ ID NO: 114 mostra um segmento exemplar de um DNA de região 1 de VatpaseH usado para fornecer um padrão para a síntese de dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0074] A SEQ ID NO: 115 mostra um segmento exemplar de um DNA de região 2 de VatpaseH usado para fornecer um padrão para a síntese de dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0075] A SEQ ID NO: 116 mostra um segmento exemplar de um DNA de Rho1 usado para fornecer um padrão para a síntese de dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0076] A SEQ ID NO: 117 mostra um filamento senso de RNA de VatpaseC exemplar ("VatpaseC5'-15") usado como um dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0077] A SEQ ID NO: 118 mostra um outro filamento senso de RNA de VatpaseC exemplar ("VatpaseC5'-25") usado como um dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0078] A SEQ ID NO: 119 mostra um outro filamento senso de

RNA de VatpaseC exemplar ("VatpaseC3'-15") usado como um dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0079] A SEQ ID NO: 120 mostra um outro filamento senso de RNA de VatpaseC exemplar ("VatpaseC3'-25") usado como um dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0080] As SEQ ID NOs: 121 a 126 mostram iniciadores usados para ampliar porções de um gene VatpaseC de *Diabrotica* como padrões para a síntese de dsRNA.

[0081] A SEQ ID NO: 127 mostra um filamento senso de VatpaseC exemplar ("VatpaseC5'-50") usado como um padrão para dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0082] A SEQ ID NO: 128 mostra um filamento senso de VatpaseC exemplar ("VatpaseC5'-100") usado como um padrão para dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0083] A SEQ ID NO: 129 mostra um filamento senso de VatpaseC exemplar ("VatpaseC-174") usado como um padrão para dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0084] A SEQ ID NO: 130 mostra um filamento senso de VatpaseC exemplar ("VatpaseC3'-50") usado como um padrão para dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0085] A SEQ ID NO: 131 mostra um filamento senso de VatpaseC exemplar ("VatpaseC3'-100") usado como um dsRNA em bioensaios de alimentação por dieta.

[0086] As SEQ ID NOs: 132 a 135 mostram iniciadores usados para análises moleculares de milho transgênico.

[0087] A SEQ ID NO: 136 mostra um íntron de ST-LS1 que pode ser útil em alguns modalidades para formar um RNA do tipo grampo de cabelo.

[0088] As SEQ ID NOs: 137 a 138 mostram fragmentos não contíguos exemplares de um cDNA de Rho1 de *Diabrotica*.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Visão geral de várias modalidades

[0089] Divulgados aqui são métodos e composições para o controle genético de infestações por praga de coleóptero. Métodos para identificar um ou mais genes essenciais para o ciclo de vida de uma praga de coleóptero para uso como um gene alvo para o controle mediado por RNAi de uma população de praga de coleóptero também são fornecidos. Vetores plasmídicos de DNA que codificam moléculas de dsRNA podem ser designados para suprimir um ou mais genes alvos essenciais para o crescimento, sobrevivência, desenvolvimento, e/ou reprodução. Em algumas modalidades, métodos são fornecidos para a repressão pós-transcricional da expressão ou inibição de um gene alvo por intermédio de moléculas de ácido nucleico que são complementares a uma sequência de codificação ou que não de codificação do gene alvo em uma praga de coleóptero. Nestas e outras modalidades, uma praga de coleóptero pode ingerir uma ou mais moléculas de dsRNA, siRNA, miRNA, e/ou hpRNA transcritas de toda ou uma porção de uma molécula de ácido nucleico que é complementar a uma sequência de codificação ou que não de codificação de um gene alvo, deste modo fornecendo um efeito protetivo de planta.

[0090] Assim, algumas modalidades envolvem a inibição específica de sequência da expressão de produtos de gene alvo, usando dsRNA, siRNA, miRNA, e/ou hpRNA que é complementar a sequências de codificação e/ou que não de codificação do(s) gene(s) alvo(s) para obter pelo menos controle parcial de uma praga de coleóptero. Divulgado é um conjunto de moléculas de ácido nucleico isoladas e purificadas compreendendo uma sequência de nucleotídeo, por exemplo, como apresentado em uma das SEQ ID NOs: 1 a 4, 9 a 11, e 104 a 106. Em algumas modalidades, uma molécula de dsRNA estabilizada pode ser expressada a partir destas sequências, fragmentos des-

tas, ou um gene compreendendo uma destas sequências, para o silenciamento pós-transcricional ou inibição de um gene alvo. Em certas modalidades, moléculas de ácido nucleico isoladas e purificadas compreendem a SEQ ID NO: 3 e/ou toda ou parte da SEQ ID NO: 9.

[0091] Algumas modalidades envolvem uma célula hospedeira recombinante (por exemplo, uma célula de planta) tendo em seu genoma pelo menos uma sequência de DNA recombinante que codifica pelo menos uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA). Em modalidades particulares, a(s) molécula(s) de dsRNA pode(m) ser expressada(s) quando ingerida(s) por uma praga de coleóptero para pós-transcricionalmente silenciar ou inibir a expressão de um gene alvo na praga de coleóptero. A sequência de DNA recombinante pode compreender, por exemplo, qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 4, 9 a 11, e 104 a 106, fragmentos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 4, 9 a 11, e 104 a 106, ou uma sequência parcial de um gene compreendendo uma das SEQ ID NOs: 1 a 4, 9 a 11, e 104 a 106, ou complementos destas.

[0092] Modalidades particulares envolvem uma célula hospedeira recombinante tendo em seu genoma uma sequência de DNA recombinante que codifica pelo menos uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA) compreendendo a SEQ ID NO: 3 e/ou toda ou parte da SEQ ID NO: 5. Quando ingerida(s) por uma praga de coleóptero, a(s) molécula(s) de iRNA pode(s) silenciar ou inibir a expressão de um gene de subunidade H de ATPase vacuolar alvo compreendendo as SEQ ID NOs: 3 e 9 a 11 na praga de coleóptero, e deste modo resultar na cessação do crescimento, desenvolvimento, reprodução, e/ou alimentação na praga de coleóptero.

[0093] Em algumas modalidades, uma célula hospedeira recombinante tendo em seu genoma pelo menos uma sequência de DNA recombinante que codifica pelo menos uma molécula de dsRNA pode

ser uma célula de planta transformada. Algumas modalidades envolvem plantas transgênicas compreendendo uma tal célula de planta transformada. Além de tais plantas transgênicas, plantas de progênie de qualquer geração de planta transgênica, sementes transgênicas, e produtos de planta transgênica, são todas fornecidas, cada uma das quais compreende sequência(s) de DNA recombinante. Em modalidades particulares, uma molécula de dsRNA da invenção pode ser expressada em uma célula de planta transgênica. Portanto, nestas e outras modalidades, uma molécula de dsRNA da invenção pode ser isolada de uma célula de planta transgênica. Em modalidades particulares, a planta transgênica é uma planta selecionada do grupo compreendendo milho (*Zea mays*), soja (*Glycine max*), e plantas da família *Poaceae*.

[0094] Algumas modalidades envolvem um método para modular a expressão de um gene alvo em uma célula de praga de coleóptero. Nestas e outras modalidades, uma molécula de ácido nucleico pode ser fornecida, em que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica uma molécula de dsRNA. Em modalidades particulares, uma sequência de nucleotídeo que codifica uma molécula de dsRNA pode ser operativamente ligada a um promotor, e também pode ser operativamente ligada a uma sequência de terminação de transcrição. Em modalidades particulares, um método para modular a expressão de um gene alvo em uma célula de praga de coleóptero pode compreender: (a) transformar uma célula de planta com um vetor compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma molécula de dsRNA; (b) cultivar a célula de planta transformada sob condições suficientes para levar em consideração o desenvolvimento de uma cultura de célula de planta compreendendo uma pluralidade de células de plantas transformadas; (c) selecionar quanto a uma célula de planta transformada que tem integrado o vetor em seu

genoma; e (d) determinar que a célula de planta transformada selecionada compreende a molécula de dsRNA codificada pela sequência de nucleotídeo do vetor. Uma planta pode ser regenerada a partir de uma célula de planta que tem o vetor integrado em seu genoma e compreende a molécula de dsRNA codificada pela sequência de nucleotídeo do vetor.

[0095] Assim, também divulgada é uma planta transgênica compreendendo um vetor tendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma molécula de dsRNA integrada em seu genoma, em que a planta transgênica compreende a molécula de dsRNA codificada pela sequência de nucleotídeo do vetor. Em modalidades particulares, a expressão de uma molécula de dsRNA na planta é suficiente para modular a expressão de um gene alvo em uma célula de uma praga de coleóptero que contata a planta ou célula de planta transformadas, por exemplo, alimentando-se na planta transformada, uma parte da planta (por exemplo, raiz) ou célula de planta. Plantas transgênicas divulgadas aqui podem exibir resistência e/ou tolerância realçada a infestações por praga de coleóptero. Plantas transgênicas particulares podem exibir resistência e/ou tolerância realçada a uma ou mais pragas de coleópteros selecionadas do grupo consistindo em: WCR; NCR; SCR; MCR; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; e *D. u. undecimpunctata* Mannerheim.

[0096] Também divulgados aqui são métodos para a liberação de agentes de controle, tal como uma molécula de iRNA, a uma praga de coleóptero. Tais agentes de controle podem causar, direta ou indiretamente, um dano na capacidade da praga de coleóptero para alimentar, crescer ou de outro modo causar dano a um hospedeiro. Em algumas modalidades, um método é fornecido compreendendo a liberação de uma molécula de dsRNA estabilizada a uma praga de coleóptero para suprimir pelo menos um gene alvo na praga de coleóptero,

deste modo reduzindo ou eliminando o dano à planta por uma praga de coleóptero. Em algumas modalidades, um método de inibir a expressão de um gene alvo em uma praga de coleóptero pode resultar na cessação do crescimento, desenvolvimento, reprodução, e/ou alimentação na praga de coleóptero. Em algumas modalidades, o método pode resultar eventualmente na morte da praga de coleóptero.

[0097] Em algumas modalidades, composições (por exemplo, uma composição tópica) são fornecidas que compreendem uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA) da invenção para uso em plantas, animais, e/ou no ambiente de uma planta ou animal para obter a eliminação ou redução de uma infestação por praga de coleóptero. Em modalidades particulares, a composição pode ser uma composição nutricional ou fonte de alimento a ser alimentada à praga de coleóptero. Algumas modalidades compreendem tornar a composição nutricional ou fonte de alimento disponível à praga de coleóptero. A ingestão de uma composição compreendendo moléculas de iRNA pode resultar na absorção das moléculas por uma ou mais células da praga de coleóptero, que por sua vez pode resultar na inibição da expressão de pelo menos um gene alvo em célula(s) da praga de coleóptero. A ingestão de ou dano a uma planta ou célula de planta por uma praga de coleóptero pode ser limitada ou eliminada dentro ou sobre qualquer tecido do hospedeiro ou ambiente em que a praga de coleóptero está presente fornecendo-se uma ou mais composições compreendendo uma molécula de iRNA da invenção no hospedeiro da praga de coleóptero.

[0098] As composições e métodos divulgados aqui podem ser usados juntos em combinações com outros métodos e composições para controlar o dano por pragas de coleópteros. Por exemplo, uma molécula de iRNA como descrito aqui para proteger plantas de pragas de coleópteros pode ser usada em um método compreendendo o uso

adicional de um ou mais agentes químicos eficazes contra uma praga de coleóptero, biopesticidas eficazes contra uma praga de coleóptero, rotação de culturas, ou técnicas genéticas recombinantes que exibem características diferentes das características dos métodos mediados por RNAi e composições de RNAi da invenção (por exemplo, produção recombinante de proteínas em plantas que são nocivas a uma praga de coleóptero (por exemplo, toxinas Bt)).

II. Abreviações

dsRNA	ácido ribonucleico de fita dupla
GI	inibição do crescimento
NCBI	National Center for Biotechnology Information
gDNA	DNA genômico
iRNA	ácido ribonucleico inibitório
ORF	fase de leitura aberta
RNAi	interferência do ácido ribonucleico
miRNA	ácido ribonucleico microinibitório
siRNA	ácido ribonucleico inibitório pequeno
hpRNA	ácido ribonucleico do tipo grampo de cabelo
UTR	região não traduzida
WCR	crisomelídeo do milho ocidental (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> LeConte)
NCR	crisomelídeo do milho do norte (<i>Diabrotica barberi</i> Smith e Lawrence)
MCR	crisomelídeo do milho mexicano (<i>Diabrotica virgifera zea</i> Kryan e Smith)
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
SCR	crisomelídeo do milho do sul (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> Barber)

III. Termos

[0099] Na descrição e tabelas que seguem, vários termos são usados. De modo a fornecer um entendimento claro e consistente do relatório descritivo e reivindicações, incluindo o escopo a serem dados tais termos, as definições seguintes são fornecidas:

[00100] Praga de coleóptero: Como usado aqui, o termo "praga de coleóptero" refere-se a insetos do gênero *Diabrotica* que alimentam-se de milho e outras gramíneas. Em exemplos particulares, uma praga de coleóptero é selecionada da lista compreendendo *D. v. virgifera* LeConte (WCR); *D. barberi* Smith e Lawrence (NCR); *D. u. howardi* (SCR); *D. v. zea* (MCR); *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; e *D. u. undecimpunctata* Mannerheim.

[00101] Contato (com um organismo): Como usado aqui, o termo "contato com" ou "absorção por" um organismo (por exemplo, uma praga de coleóptero), com referência a uma molécula de ácido nucleico, inclui a internalização da molécula de ácido nucleico no organismo, por exemplo e sem limitação: ingestão da molécula pelo organismo (por exemplo, por alimentação); contato do organismo com uma composição compreendendo a molécula de ácido nucleico; e imersão de organismos com uma solução compreendendo a molécula de ácido nucleico.

[00102] Contig: Como usado aqui o termo "contig" refere-se a uma sequência de DNA que é reconstruída a partir de um conjunto de segmentos de DNA sobrepostos derivados de uma única fonte genética.

[00103] Planta do milho: Como usado aqui, o termo "planta do milho" refere-se a uma planta da espécie, *Zea mays* (milho).

[00104] Expressão: Como usado aqui, "expressão" de uma sequência de codificação (por exemplo, um gene ou um transgene) refere-se ao processo pelo qual a informação codificada de uma unidade transcricional de ácido nucleico (incluindo, por exemplo, DNA genômico ou cDNA) é convertida em uma parte operacional, não operacional, ou

estrutural de uma célula, frequentemente incluindo a síntese de uma proteína. A expressão do gene pode ser influenciada por sinais externos; por exemplo, exposição de uma célula, tecido, ou organismo a um agente que aumenta ou diminui a expressão do gene. A expressão de um gene também pode ser regulada em qualquer lugar na via de DNA a RNA à proteína. A regulação da expressão do gene ocorre, por exemplo, através de controles que agem sobre a transcrição, tradução, transporte e processamento de RNA, degradação de moléculas intermediárias tais como mRNA, ou através de ativação, inativação, compartimentalização, ou degradação de moléculas de proteína específicas depois que elas foram fabricadas, ou por combinações destes. A expressão do gene pode ser medida no nível de RNA ou no nível de proteína por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, sem limitação, Northern blot, RT-PCR, Western blot, ou ensaios de atividade de proteína *in vitro*, *in situ*, ou *in vivo*.

[00105] Material genético: Como usado aqui, o termo "material genético" inclui todos os genes, e moléculas de ácido nucleico, tais como DNA e RNA.

[00106] Inibição: Como usado aqui, o termo "inibição," quando usado para descrever um efeito sobre uma sequência de codificação (por exemplo, um gene), refere-se a uma diminuição mensurável no nível celular de mRNA transcrito a partir da sequência de codificação e/ou peptídeo, polipeptídeo, ou produto de proteína da sequência de codificação. Em alguns exemplos, a expressão de uma sequência de codificação pode ser inibida tal que a expressão é aproximadamente eliminada. "Inibição específica" refere-se à inibição de uma sequência de codificação alvo sem consequentemente afetar a expressão de outras sequências de codificação (por exemplo, genes) na célula em que a inibição específica está sendo realizada.

[00107] Isolado: Um componente biológico "isolado" (tal como um

ácido nucleico ou proteína) foi substancialmente separado, produzido à parte de, ou purificado longe de outros componentes biológicos na célula do organismo em que o componente naturalmente ocorre, isto é, outro DNA e RNA cromossômicos e extracromossômicos, e proteínas. Moléculas de ácido nucleico e proteínas que foram "isoladas" incluem moléculas de ácido nucleico e proteínas purificadas por métodos de purificação padrão. O termo também inclui ácidos nucleicos e proteínas preparados por expressão recombinante em uma célula hospedeira, assim como moléculas de ácido nucleico quimicamente sintetizadas, proteínas, e peptídeos.

[00108] Molécula de ácido nucleico: Como usado aqui, o termo "molécula de ácido nucleico" pode referir-se a uma forma polimérica de nucleotídeos, que pode incluir tanto filamentos senso quanto antissenso de RNA, cDNA, DNA genômico, e formas sintéticas e polímeros mistos do acima. Um nucleotídeo pode referir-se a um ribonucleotídeo, desoxirribonucleotídeo, ou uma forma modificada de cada tipo de nucleotídeo. Uma "molécula de ácido nucleico" como usado aqui é sinônima com "ácido nucleico" e "polinucleotídeo." Uma molécula de ácido nucleico é usualmente de pelo menos 10 bases em comprimento, a menos que de outro modo especificado. A sequência de nucleotídeo de uma molécula de ácido nucleico é lida da extremidade 5' a 3' da molécula por convenção. O "complemento" de uma sequência de nucleotídeo refere-se à sequência, de 5' a 3', das nucleobases que formam pares de base com as nucleobases da sequência de nucleotídeo (isto é, A-T/U, e G-C). O "complemento reverso" de uma sequência de ácido nucleico refere-se à sequência, de 3' a 5', das nucleobases que formam pares de base com as nucleobases da sequência de nucleotídeo.

[00109] "Moléculas de ácido nucleico" incluem formas de fita única e dupla de DNA; formas de fita única de RNA; e formas de fita dupla

de RNA (dsRNA). O termo "sequência de nucleotídeo" ou "sequência de ácido nucleico" refere-se tanto a fitas senso quanto antissenso de um ácido nucleico como fitas únicas individuais ou no dúplice. O termo "ácido ribonucleico" (RNA) é inclusivo de iRNA (RNA inibitório), dsRNA (RNA de fita dupla), siRNA (RNA interferente pequeno), mRNA (RNA mensageiro), miRNA (micro-RNA), hpRNA (RNA do tipo grampo de cabelo), tRNA (RNA de transferência, se carregado ou descarregado com um aminoácido acilado correspondente), e cRNA (RNA complementar). O termo "ácido desoxirribonucleico" (DNA) é inclusivo de cDNA, DNA genômico, e híbridos de DNA-RNA. Os termos "segmento de ácido nucleico" e "segmento de sequência de nucleotídeo," ou mais geralmente "segmento," serão entendidos por aqueles na técnica como um termo funcional que inclui tanto sequências genômicas, sequências de RNA ribossômico, sequências de RNA de transferência, sequências de RNA mensageiro, sequências de operon, quanto sequências de nucleotídeo engendrado menores que codificaram ou podem ser adaptadas para codificar, peptídeos, polipeptídeos, ou proteínas.

[00110] Oligonucleotídeo: Um oligonucleotídeo é um polímero de ácido nucleico curto. Oligonucleotídeos podem ser formados por clivagem de segmentos de ácido nucleico mais longos, ou polimerizando-se precursores de nucleotídeo individuais. Sintetizadores automáticos permitem a síntese de oligonucleotídeos até várias centenas de pares de base em comprimento. Porque os oligonucleotídeos podem ligar-se a uma sequência de nucleotídeo complementar, eles podem ser usados como sondas para detectar DNA ou RNA. Oligonucleotídeos compostos de DNA (oligodesoxirribonucleotídeos) podem ser usados em PCR, uma técnica para a ampliação de sequências DNA e RNA (transcritas reversas em um cDNA). Em PCR, o oligonucleotídeo é tipicamente referido como um "iniciador," que permite que uma DNA po-

limerase estenda o oligonucleotídeo e replique a fita complementar.

[00111] Uma molécula de ácido nucleico pode incluir qualquer um ou ambos os nucleotídeos que ocorrem naturalmente e modificados ligados entre si por ligações de nucleotídeo que ocorrem naturalmente e/ou que não ocorrem naturalmente. Moléculas de ácido nucleico podem ser modificadas química ou bioquimicamente, ou podem conter bases de nucleotídeo não naturais ou derivadas, como será facilmente avaliado por aqueles de habilidade na técnica. Tais modificações incluem, por exemplo, rótulos, metilação, substituição de um ou mais dos nucleotídeos que ocorrem naturalmente com um análogo, modificações internucleotídeo (por exemplo, ligações descarregadas: por exemplo, fosfonatos de metila, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.; ligações carregadas: por exemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.; porções pendentes: por exemplo, peptídeos; intercaladores: por exemplo, acridina, psoraleno, etc.; queladores; alquiladores; e ligações modificadas: por exemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). O termo "molécula de ácido nucleico" também inclui qualquer conformação topológica, incluindo conformações de fita única, de fita dupla, parcialmente do tipo dúplex, do tipo tríplex, do tipo grampo de cabelo, circulares, e do tipo cadeado.

[00112] Como usado aqui com respeito ao DNA, o termo "sequência de codificação", "sequência de nucleotídeo estrutural," ou "molécula de ácido nucleico estrutural" refere-se a uma sequência de nucleotídeo que é basicamente traduzida em um polipeptídeo, por intermédio de transcrição e mRNA, quando colocada sob o controle de sequências reguladoras apropriadas. Com respeito ao RNA, o termo "sequência de codificação" refere-se a uma sequência de nucleotídeo que é traduzida em um peptídeo, polipeptídeo, ou proteína. Os limites de uma sequência de codificação são determinados por um códon de início da tradução no término 5' e um códon de parada da tradução no

término 3'. Sequências de codificação incluem, mas não são limitadas a: DNA genômico; cDNA; EST; e sequências de nucleotídeo recombinante.

[00113] Genoma: Como usado aqui, o termo "genoma" refere-se ao DNA cromossômico encontrado dentro do núcleo de uma célula, e também refere-se ao DNA em organelas encontrado dentro de componentes subcelulares da célula. Em algumas modalidades da invenção, uma molécula de DNA pode ser introduzida em um célula de planta tal que a molécula de DNA é integrada no genoma da célula de planta. Nestas e outras modalidades, a molécula de DNA pode ser integrada no DNA nuclear da célula de planta, ou integrado no DNA do cloroplasto ou mitocôndria da célula de planta. O termo "genoma" conforme ele aplica-se a bactérias refere-se tanto a cromossomo quanto plasmídeos dentro da célula bacteriana. Em algumas modalidades da invenção, uma molécula de DNA pode ser introduzida em uma bactéria tal que a molécula de DNA é integrada no genoma da bactéria. Nestas e outras modalidades, a molécula de DNA pode ser cromossomicamente integrada ou localizada como ou em um plasmídeo estável.

[00114] Identidade de sequência: O termo "identidade de sequência" ou "identidade," como usado aqui no contexto de duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo, refere-se aos resíduos nas duas sequências que são os mesmos quando alinhados para correspondência máxima em uma janela de comparação específica.

[00115] Como usado aqui, o termo "porcentagem de identidade de sequência" pode referir-se ao valor determinado comparando-se duas sequências idealmente alinhadas (por exemplo, sequências de ácido nucleico) em uma janela de comparação, em que a porção da sequência na janela de comparação pode compreender adições ou supressões (isto é, intervalos) quando comparado à sequência de referência

(que não compreende adições ou supressões) para o alinhamento ideal das duas sequências. A porcentagem é calculada determinando-se o número de posições em que o resíduo de nucleotídeo ou aminoácido idêntico ocorre em ambas as sequências para produzir o número de posições emparelhadas, dividindo o número de posições emparelhadas pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicando o resultado por 100 para produzir a porcentagem de identidade de sequência. Uma sequência que é idêntica em cada posição em comparação a uma sequência de referência é dita ser 100 % idêntica à sequência de referência, e vice-versa.

[00116] Métodos para alinhar sequências para comparação são bem conhecidos na técnica. Vários programas e algoritmos de alinhamento são descritos em, por exemplo: Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482; Needleman e Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443; Pearson e Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444; Higgins e Sharp (1988) *Gene* 73:237-44; Higgins e Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-3; Corpet *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90; Huang *et al.* (1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65; Pearson *et al.* (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31; Tatiana *et al.* (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50. Uma consideração detalhada de métodos de alinhamento de sequência e cálculos de homologia pode ser encontrada em, por exemplo, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

[00117] National Center for Biotechnology Information (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool (BLAST™; Altschul *et al.* (1990)) está disponível a partir de várias fontes, incluindo o National Center for Biotechnology Information (Bethesda, MD), e na internet, para uso em combinação com vários programas de análise de sequência. Uma descrição de como determinar a identidade de sequência usando este programa está disponível na internet sob a seção de "ajuda" para BLAST™. Para comparações de sequências de ácido nucleico, a fun-

ção das "sequências de Blast 2" do programa BLAST™ (Blastn) pode ser utilizada usando a matriz BLOSUM62 padrão designada para parâmetros padrão. Sequências de ácido nucleico com similaridade ainda maior às sequências de referência mostrarão identidade percentual crescente quando avaliadas por este método.

[00118] Especificamente hibridizável/Especificamente complementar: Como usado aqui, os termos "especificamente hibridizável" e "especificamente complementar" são termos que indicam um grau suficiente de complementaridade tal que a ligação estável e específica ocorre entre a molécula de ácido nucleico e uma molécula de ácido nucleico alvo. A hibridização entre duas moléculas de ácido nucleico envolve a formação de um alinhamento antiparalelo entre as sequências de ácido nucleico das duas moléculas de ácido nucleico. As duas moléculas são depois capazes de formar ligações de hidrogênio com bases correspondentes na fita oposta para formar uma molécula dupla que, se ela for suficientemente estável, é detectável usando métodos bem conhecidos na técnica. Uma molécula de ácido nucleico não precisa ser 100% complementar à sua sequência alvo para ser especificamente hibridizável. Entretanto, a quantidade de complementaridade de sequência que deve existir para que a hibridização seja específica é uma função das condições de hibridização usadas.

[00119] Condições de hibridização que resultam em graus particulares de severidade variarão dependendo da natureza do método de hibridização de escolha e da composição e comprimento das sequências de ácido nucleico hibridizantes. Geralmente, a temperatura da hibridização e a força iônica (especialmente a concentração de Na⁺ e/ou Mg⁺⁺) do tampão de hibridização determinarão a severidade da hibridização, entretanto tempos de lavagem e as composições de tampões de lavagem também influenciam a severidade. Cálculos com respeito às condições de hibridização necessárias para atingir graus particula-

res de severidade são conhecidos àqueles de habilidade comum na técnica, e são debatidos, por exemplo, em Sambrook *et al.* (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, capítulos 9 e 11; e Hames e Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985. Instrução e orientação adicionais detalhadas com referência à hibridização de ácidos nucleicos podem ser encontradas, por exemplo, em Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," em Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2, Elsevier, NY, 1993; e Ausubel *et al.*, Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995.

[00120] Como usado aqui, "condições severas" abrangem condições sob as quais a hibridização apenas ocorrerá se houver menos do que 20 % de disparidade entre a molécula de hibridização e uma sequência homóloga dentro da molécula de ácido nucleico alvo. "Condições severas" incluem outros níveis particulares de severidade. Assim, como usado aqui, condições de "severidade moderada" são aquelas sob as quais moléculas com mais do que 20 % de disparidade de sequência não hibridizarão; condições de "severidade alta" são aquelas sob as quais sequências com mais do que 10 % de disparidade não hibridizarão; e condições de "severidade muito alta" são aquelas sob as quais sequências com mais do que 5 % de disparidade não hibridizarão.

[00121] As seguintes são condições de hibridização representativas, não limitantes.

[00122] Condição de severidade alta (detecta sequências que compartilham pelo menos 90% de identidade de sequência): Hibridização em 5x tampão de SSC a 65°C durante 16 horas; lavagem duas vezes

em 2x tampão de SSC na temperatura ambiente durante 15 minutos cada; e lavagem duas vezes em 0,5x tampão de SSC a 65°C durante 20 minutos cada.

[00123] Condição de severidade moderada (detecta sequências que compartilham pelo menos 80% de identidade de sequência): Hibridização em 5x-6x tampão de SSC a 65 a 70°C durante 16 a 20 horas; lavagem duas vezes em 2x tampão de SSC na temperatura ambiente durante 5 a 20 minutos cada; e lavagem duas vezes em 1x tampão de SSC a 55 a 70°C durante 30 minutos cada.

[00124] Condição de controle não severa (sequências que compartilham pelo menos 50% de identidade de sequência hibridizarão): Hibridização em 6x tampão de SSC na temperatura ambiente até 55°C durante 16 a 20 horas; lavagem pelo menos duas vezes em 2x-3x tampão de SSC na temperatura ambiente até 55°C durante 20 a 30 minutos cada.

[00125] Como usado aqui, o termo "substancialmente homóloga" ou "homologia substancial," com referência a uma sequência de ácido nucleico contígua, refere-se a sequências de nucleotídeo contíguas que hibridizam sob condições severas à sequência de ácido nucleico de referência. Por exemplo, sequências de ácido nucleico que são substancialmente homólogas a uma sequência de ácido nucleico de referência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7 são aquelas sequências de ácido nucleico que hibridizam sob condições severas (por exemplo, as condições de severidade moderada apresentadas, *supra*) à sequência de ácido nucleico de referência de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 7. Sequências substancialmente homólogas podem ter pelo menos 80% de identidade de sequência. Por exemplo, sequências substancialmente homólogas podem ter de cerca de 80% a 100% de identidade de sequência, tal como cerca de 81%; cerca de 82%; cerca de 83%; cerca de 84%; cerca de 85%; cerca de 86%; cerca de

87%; cerca de 88%; cerca de 89%; cerca de 90%; cerca de 91%; cerca de 92%; cerca de 93%; cerca de 94% cerca de 95%; cerca de 96%; cerca de 97%; cerca de 98%; cerca de 98,5%; cerca de 99%; cerca de 99,5%; e cerca de 100%. A propriedade de homologia substancial é intimamente relacionada à hibridização específica. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico é especificamente hibridizável quando há um grau suficiente de complementaridade para evitar a ligação não específica do ácido nucleico a sequências não alvos sob condições onde a ligação específica é desejada, por exemplo, sob condições severas de hibridização.

[00126] Como usado aqui, o termo "ortólogo" refere-se a um gene em duas ou mais espécies que evoluíram-se de uma sequência de nucleotídeo de ancestral comum, e podem manter a mesma função nas duas ou mais espécies.

[00127] Como usado aqui, duas moléculas da sequência de ácido nucleico são ditas exibir "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma sequência lida na direção 5' a 3' é complementar a cada nucleotídeo da outra sequência quando lida na direção 3' a 5'. Uma sequência de nucleotídeo que é complementar a uma sequência de nucleotídeo de referência exibirá uma sequência idêntica à sequência de complemento reverso da sequência de nucleotídeo de referência. Estes termos e descrições são bem definidos na técnica e são facilmente entendidos por aqueles de habilidade comum na técnica.

[00128] Operavelmente ligada: Uma primeira sequência de nucleotídeo é operavelmente ligada com uma segunda sequência de ácido nucleico quando a primeira sequência de ácido nucleico está em uma relação funcional com a segunda sequência de ácido nucleico. Quando sequências de ácido nucleico operavelmente ligadas, recombinantemente produzidas são geralmente contíguas, e, onde necessário para unir duas regiões de codificação de proteína, na mesma fase de lei-

tura (por exemplo, em uma ORF policistrônica). Entretanto, ácidos nucleicos não precisam ser contíguos para ser operavelmente ligados.

[00129] O termo, "operavelmente ligada," quando usado em referência a uma sequência reguladora e uma sequência de codificação, significa que a sequência reguladora afeta a expressão da sequência de codificação ligada. "Sequências reguladoras," ou "elementos de controle," referem-se a sequências de nucleotídeo que influenciam a periodicidade e nível/quantidade de transcrição, processamento ou estabilidade do RNA, ou tradução da sequência de codificação associada. Sequências reguladoras podem incluir promotores; sequências líderes de tradução; íntrons; realçadores; estruturas de haste-alça; sequências de ligação ao repressor; sequências de terminação; sequências de reconhecimento de poliadenilação; etc. Sequências reguladoras particulares podem ser localizadas a montante e/ou a jusante de uma sequência de codificação operavelmente ligada a estas. Também, sequências reguladoras particulares operavelmente ligadas a uma sequência de codificação podem ser localizadas na fita complementar associada de uma molécula de ácido nucleico de fita dupla.

[00130] Promotor: Como usado aqui, o termo "promotor" refere-se a uma região do DNA que pode estar a montante do início da transcrição, e que pode estar envolvida no reconhecimento e ligação de RNA polimerase e outras proteínas para iniciar a transcrição. Um promotor pode ser operavelmente ligado a uma sequência de codificação para a expressão em uma célula, ou um promotor pode ser operavelmente ligado a uma sequência de nucleotídeo que codifica uma sequência de sinal que pode ser operavelmente ligada a uma sequência de codificação para a expressão em uma célula. Um "promotor de planta" pode ser um promotor capaz de iniciar a transcrição em células de plantas. Exemplos de promotores sob controle de desenvolvimento incluem promotores que preferencialmente iniciam a transcrição em certos te-

cidos, tais como folhas, raízes, sementes, fibras, vasos do xilema, traqueídes, ou esclerênquima. Tais promotores são referidos como "preferidos de tecido." Promotores que iniciam a transcrição apenas em certos tecidos são referidos como "específicos de tecido." Um promotor "específico do tipo de célula" primariamente conduz a expressão em certos tipos de células em um ou mais órgãos, por exemplo, células vasculares em raízes ou folhas. Um promotor "induzível" pode ser um promotor que pode estar sob controle ambiental. Exemplos de condições ambientais que podem iniciar a transcrição por promotores induzíveis incluem condições anaeróbicas e a presença de luz. Promotores específicos de tecido, preferidos de tecido, específico do tipo de célula, e promotores induzíveis constituem a classe de promotores "não constitutivos". Um promotor "constitutivo" é um promotor que pode ser ativo sob a maioria das condições ambientais ou na maioria de tipos de célula ou tecido.

[00131] Qualquer promotor induzível pode ser usado em algumas modalidades da invenção. *Ver Ward et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 22:361-366. Com um promotor induzível, a taxa de transcrição aumenta em resposta a um agente de indução. Promotores induzíveis exemplares incluem, mas não são limitados a: Promotores do sistema de ACEI que responde a cobre; gene *In2* do milho que responde a fitoprotetores de benzenossulfonamida; repressor Tet de Tn10; e o promotor induzível de um gene de hormônio esteroide, a atividade transcricional da qual pode ser induzida por um hormônio glicocorticosteroide (Scheda *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:0421).

[00132] Promotores constitutivos exemplares incluem, mas não são limitados a: Promotores de vírus de plantas, tal como o promotor 35S de vírus do mosaico da couve-flor (CaMV); promotores de genes de actina de arroz; promotores de ubiquitina; pEMU; MAS; promotor de histona H3 do milho; e o promotor de ALS, fragueto de Xba1/NcoI 5'

ao gene estrutural de *Brassica napus* *ALS3* (ou uma similaridade de sequência de nucleotídeo ao dito fragmento de Xba1/NcoI) (Publicação PCT Internacional Nº WO 96/30530).

[00133] Adicionalmente, qualquer promotor específico de tecido ou preferido de tecido pode ser utilizado em algumas modalidades da invenção. Plantas transformadas com uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de codificação operavelmente ligada a um promotor específico de tecido podem produzir o produto da sequência de codificação exclusivamente, ou preferencialmente, em um tecido específico. Promotores específicos de tecido ou preferidos de tecido exemplares incluem, mas não são limitados a: Um promotor preferido da raiz, tal como aquele do gene de faseolina; um promotor específico da folha e induzido por luz tal como aquele de *cab* ou *rubisco*; um promotor específico da antera tal como aquele de *LAT52*; um promotor específico do pólen tal como aquele de *Zm13*; e um promotor preferido de micrósporo tal como aquele de *apg*.

[00134] Transformação: Como usado aqui, o termo "transformação" ou "transdução" refere-se à transferência de uma ou mais moléculas de ácido nucleico em uma célula. Uma célula é "transformada" por uma molécula de ácido nucleico transduzida na célula quando a molécula de ácido nucleico torna-se estavelmente replicada pela célula, por incorporação da molécula de ácido nucleico no genoma celular, ou por replicação epissômica. Como usado aqui, o termo "transformação" abrange todas as técnicas pelas quais uma molécula de ácido nucleico pode ser introduzida em uma tal célula. Exemplos incluem, mas não são limitados a: transfecção com vetores virais; transformação com vetores plasmídicos; eletroporação (Fromm *et al.* (1986) *Nature* 319:791-3); lipofecção (Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7); microinjeção (Mueller *et al.* (1978) *Cell* 15:579-85); transferência mediada por *Agrobacterium* (Fraley *et al.* (1983) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 80:4803-7); absorção de DNA direta; e bombardeamento de microprojétil (Klein *et al.* (1987) Nature 327:70).

[00135] Transgene: Uma sequência de ácido nucleico exógena. Em alguns exemplos, um transgene pode ser uma sequência que codifica uma ou ambas as fitas de uma molécula de dsRNA que compreende uma sequência de nucleotídeo que é complementar a uma molécula de ácido nucleico encontrada em uma praga de coleóptero. Em outros exemplos, um transgene pode ser uma sequência de ácido nucleico antissenso, em que a expressão da sequência de ácido nucleico antissenso inibe a expressão de uma sequência de ácido nucleico alvo. Ainda em outros exemplos, um transgene pode ser uma sequência de gene (por exemplo, um gene resistente a herbicida), um gene que codifica um composto industrial ou farmacologicamente útil, ou um gene que codifica uma característica agrícola desejável. Nestes e outros exemplos, um transgene pode conter sequências reguladoras operavelmente ligadas a uma sequência de codificação do transgene (por exemplo, um promotor).

[00136] Vetor: Uma molécula de ácido nucleico como introduzida em uma célula, por exemplo, para produzir uma célula transformada. Um vetor pode incluir sequências de ácido nucleico que permitem que ele replique na célula hospedeira, tal como uma origem de replicação. Exemplos de vetores incluem, mas não são limitados a: um plasmídeo; cosmídeo; bacteriófago; ou vírus que carrega DNA exógeno em uma célula. Um vetor também pode incluir um ou mais genes, sequências anti-sentido, e/ou genes marcadores selecionáveis e outros elementos genéticos conhecidos na técnica. Um vetor pode transduzir, transformar, ou infectar uma célula, deste modo fazendo com que a célula expresse as moléculas de ácido nucleico e/ou proteínas codificadas pelo vetor. Um vetor opcionalmente inclui materiais para ajudar em obter a entrada da molécula de ácido nucleico na célula (por exemplo, um li-

possomo, revestimento de proteína, etc.).

[00137] Rendimento: Um rendimento estabilizado de cerca de 100 % ou mais em relação ao rendimento de variedades de verificação no mesmo local de crescimento que crescem ao mesmo tempo e sob as mesmas condições. Em modalidades particulares, "rendimento melhorado" ou "rendimento de melhora" significa um cultivar tendo um rendimento estabilizado de 105 % a 115% ou mais em relação ao rendimento de variedades de verificação no mesmo local de crescimento contendo densidades significantes de pragas de coleópteros que são prejudiciais àquela safra que cresce ao mesmo tempo e sob as mesmas condições.

[00138] A menos que especificamente indicado ou implicado, os termos "um", "uma", e "o", "a" significam "pelo menos um" como usado aqui.

[00139] A menos que de outro modo especificamente explicado, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por aqueles de habilidade comum na técnica aos quais esta divulgação pertence. Definições de termos comuns na biologia molecular podem ser encontrada em, por exemplo, Lewin B., Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew *et al.* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Meyers R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8). Todas as porcentagens são em peso e todas as proporções de mistura de solvente são em volume a menos que de outro modo observado. Todas as temperaturas são em graus Celsius.

IV. Moléculas de ácido nucleico compreendendo uma sequência de praga de coleóptero

Visão geral

[00140] Descritas aqui são moléculas de ácido nucleico úteis para o controle de pragas de coleópteros. Moléculas de ácido nucleico descritas incluem sequências alvos (por exemplo, genes nativos, e sequências que não de codificação), dsRNAs, siRNAs, hpRNAs, e miRNAs. Por exemplo, moléculas de dsRNA, siRNA, miRNA e/ou hpRNA são descritas em algumas modalidades que podem ser especificamente complementares a todas ou parte de uma ou mais sequências de ácido nucleico nativas em uma praga de coleóptero. Nestas e outras modalidades, a(s) sequência(s) de ácido nucleico nativa(s) podem ser um ou mais genes alvos, o produto das quais pode ser, por exemplo e sem limitação: envolvido em um processo metabólico; envolvido em um processo reprodutivo; ou envolvido no desenvolvimento larval. Moléculas de ácido nucleico descritas aqui, quando introduzidas em uma célula compreendendo pelo menos uma sequência de ácido nucleico nativa à qual as moléculas de ácido nucleico são especificamente complementares, podem iniciar RNAi na célula, e conseqüentemente reduzir ou eliminar a expressão da(s) sequência(s) de ácido nucleico nativa(s). Em alguns exemplos, a redução ou eliminação da expressão de um gene alvo por uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência especificamente complementar a esta pode ser letal em pragas de coleópteros, ou resultar em crescimento e/ou reprodução reduzidos.

[00141] Em algumas modalidades, pelo menos um gene alvo em uma praga de coleóptero pode ser selecionado, em que o gene alvo compreende uma sequência de nucleotídeo selecionada da lista compreendendo D_vir_c47185_Caf1180 (SEQ ID NO: 1); D_vir_c1229_VatpaseC (SEQ ID NO: 2); D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3); e Contig_01_Rho1_1-191_CDC42 (SEQ ID NO: 4). Em exemplos particulares, um gene alvo em uma praga de coleóptero é selecionado, em que o gene alvo codifica uma subunidade H de

ATPase vacuolar e compreende a SEQ ID NO: 3.

[00142] Em algumas modalidades, um gene alvo pode ser uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica um polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido contígua que é pelo menos 85% idêntica (por exemplo, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, cerca de 100%, ou 100% idêntica) à sequência de aminoácido do produto de proteína de um de D_vir_c47185_Caf1180 (SEQ ID NO: 1); D_vir_c1229_VatpaseC (SEQ ID NO: 2); D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3); e Contig_01_Rho1_1-191_CDC42 (SEQ ID NO: 4). Um gene alvo pode ser qualquer sequência de ácido nucleico em uma praga de coleóptero, a inibição pós-transcricional do qual tem um efeito deletério sobre a praga de coleóptero, ou fornece um benefício protetivo contra a praga de coleóptero a uma planta. Em exemplos particulares, um gene alvo é uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma subunidade H de ATPase vacuolar compreendendo uma sequência de aminoácido contígua que é pelo menos 85% idêntica, cerca de 90% idêntica, cerca de 95% idêntica, cerca de 96% idêntica, cerca de 97% idêntica, cerca de 98% idêntica, cerca de 99% idêntica, cerca de 100% idêntica, ou 100% idêntica à sequência de aminoácido do produto de proteína da SEQ ID NO: 3.

[00143] Fornecidas de acordo com a invenção são sequências de nucleotídeo, a expressão das quais resulta em uma molécula de RNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a toda ou parte de uma molécula de RNA nativa que é codificada por uma sequência de codificação em uma praga de coleóptero. Em algumas modalidades, depois da ingestão da molécula de RNA expressada por uma praga de coleóptero, a infrarregulação da sequência de codificação em células da praga de coleóptero pode ser

obtida. Em modalidades particulares, a infrarregulação da sequência de codificação em células da praga de coleóptero pode resultar em um efeito deletério sobre o crescimento, viabilidade, proliferação, e/ou reprodução da praga de coleóptero.

[00144] Em algumas modalidades, sequências alvos incluem sequências de RNA que não de codificação transcritas, tais como 5'UTRs; 3'UTRs; sequências líderes unidas; sequências de íntron; sequências de outron (por exemplo, RNA de 5'UTR subsequentemente modificado em trans processamento); sequências de donatron (por exemplo, RNA que não de codificação necessário para fornecer sequências doadoras para trans processamento); e outro RNA transcrito que não de codificação de genes alvos de praga de coleóptero. Tais sequências podem ser derivadas tanto de genes mono-cistrônicos quanto poli-cistrônicos.

[00145] Assim, também descritas aqui em combinação com algumas modalidades são moléculas de iRNA (por exemplo, dsRNAs, siRNAs, miRNAs e hpRNAs) que compreendem pelo menos uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a toda ou parte de uma sequência alvo em uma praga de coleóptero. Em algumas modalidades uma molécula de iRNA pode compreender sequência(s) de nucleotídeo que são complementares a toda ou parte de uma pluralidade de sequências alvos; por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ou mais sequências alvos. Em modalidades particulares, uma molécula de iRNA pode ser produzida *in vitro*, ou *in vivo* por um organismo geneticamente modificado, tal como uma planta ou bactéria. Também divulgadas são sequências de cDNA que podem ser usadas para a produção de moléculas de dsRNA, moléculas de siRNA, moléculas de miRNA e/ou hpRNA que são especificamente complementares a toda ou parte de uma sequência alvo em uma praga de coleóptero. Ainda descritas são construções de DNA recombinante para uso

em obter transformação estável de alvos hospedeiros particulares. Alvos hospedeiros transformados podem expressar níveis eficazes de moléculas de dsRNA, siRNA, miRNA e/ou hpRNA das construções de DNA recombinante. Portanto, também descrito é um vetor de transformação de planta compreendendo pelo menos uma sequência de nucleotídeo operavelmente ligada a um promotor heterólogo funcional em uma célula de planta, em que a expressão da(s) sequência(s) de nucleotídeo resulta em uma molécula de RNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a toda ou parte de uma sequência alvo em uma praga de coleóptero.

[00146] Em algumas modalidades, moléculas de ácido nucleico úteis para o controle de pragas de coleópteros podem incluir: a sequência de ácido nucleico nativa isolada de *Diabrotica*, D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3); sequências de nucleotídeo que quando expressadas resultam em uma molécula de RNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a uma molécula de RNA nativa que é codificada por D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3); moléculas de iRNA (por exemplo, dsRNAs, siRNAs, miRNAs e hpRNAs) que compreendem pelo menos uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3); sequências de cDNA que podem ser usadas para a produção de moléculas de dsRNA, moléculas de siRNA, moléculas de miRNA e/ou hpRNA que são especificamente complementares a D_vir_c1319_VatpaseH (SEQ ID NO: 3); e construções de DNA recombinante para uso em obter transformação estável de alvos hospedeiros particulares, em que um alvo hospedeiro transformado compreende uma ou mais das moléculas de ácido nucleico precedentes.

[00147] Nestas e outras modalidades, moléculas de ácido nucleico úteis para o controle de pragas de coleópteros podem incluir: um fra-

gmento de uma subunidade H de ATPase vacuolar de *Diabrotica* compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; sequências de nucleotídeo que quando expressadas resultam em uma molécula de RNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a uma molécula de RNA de *Diabrotica* nativa compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; moléculas de iRNA (por exemplo, dsRNAs, siRNAs, miRNAs e hpRNAs) que compreendem pelo menos uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a toda ou parte da SEQ ID NO: 9; sequências de cDNA que podem ser usadas para a produção de moléculas de dsRNA, moléculas de siRNA, moléculas de miRNA e/ou hpRNA que são especificamente complementares a toda ou parte da SEQ ID NO: 9; e construções de DNA recombinante para uso em obter transformação estável de alvos hospedeiros particulares, em que um alvo hospedeiro transformado compreende uma ou mais das moléculas de ácido nucleico precedentes.

[00148] Nestas e outras modalidades, moléculas de ácido nucleico adicionais úteis para o controle de pragas de coleópteros podem incluir: D_vir_c47185_Caf1180 (SEQ ID NO: 1); D_vir_c1229_VatpaseC (subunidade C de ATPase vacuolar) (SEQ ID NO: 2); e Contig_01_Rho1_1-191_CDC42 (proteína de ligação a GTP pequena de Rho1) (SEQ ID NO: 4); sequências de nucleotídeo que quando expressadas resultam em uma molécula de RNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a uma molécula de RNA nativa que é codificada por D_vir_c47185_Caf1180 (SEQ ID NO: 1); D_vir_c1229_VatpaseC (SEQ ID NO: 2); ou Contig_01_Rho1_1-191_CDC42 (SEQ ID NO: 4); moléculas de iRNA (por exemplo, dsRNAs, siRNAs, miRNAs e hpRNAs) que compreendem pelo menos uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a D_vir_c47185_Caf1180 (SEQ ID NO: 1);

D_vir_c1229_VatpaseC (SEQ ID NO: 2); ou Contig_01_Rho1_1-191_CDC42 (SEQ ID NO: 4); sequências de cDNA que podem ser usadas para a produção de moléculas de dsRNA, moléculas de siRNA, moléculas de miRNA e/ou hpRNA que são especificamente complementares a D_vir_c47185_Caf1180 (SEQ ID NO: 1); D_vir_c1229_VatpaseC (SEQ ID NO: 2); ou Contig_01_Rho1_1-191_CDC42 (SEQ ID NO: 4); e construções de DNA recombinante para uso em obter transformação estável de alvos hospedeiros particulares, em que um alvo hospedeiro transformado compreende uma ou mais das moléculas de ácido nucleico precedentes.

B. Moléculas de ácido nucleico

[00149] A presente invenção fornece, *inter alia*, moléculas de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA e hpRNA) que inibem a expressão de gene alvo em uma célula, tecido, ou órgão de uma praga de coleóptero; e moléculas de DNA capazes de ser expressadas como uma molécula de iRNA em uma célula ou micro-organismo para inibir a expressão de gene alvo em uma célula, tecido, ou órgão de uma praga de coleóptero.

[00150] Algumas modalidades da invenção fornecem uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo pelo menos uma (por exemplo, uma, duas, três, ou mais) sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 9; o complemento da SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; o complemento da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; o complemento da SEQ ID NO: 11; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* (por exemplo, WCR) compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11;

o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; o complemento de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9. Em modalidades particulares, o contato com ou absorção por uma praga de coleóptero da sequência de ácido nucleico isolada inibe o crescimento, desenvolvimento, reprodução e/ou alimentação da praga de coleóptero.

[00151] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico isolada da invenção pode compreender ainda pelo menos uma (por exemplo, uma, duas, três, ou mais) sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: toda ou parte da SEQ ID NO: 1; todo ou parte do complemento da SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; o complemento da SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; o complemento da SEQ ID

NO: 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* (por exemplo, WCR) compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, ou 4; o complemento de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, ou 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, ou 4; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, ou 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, ou 4; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 3, ou 4. Em modalidades particulares, o contato com ou absorção por uma praga de coleóptero da sequência de ácido nucleico isolada inibe o crescimento, desenvolvimento, reprodução e/ou alimentação da praga de coleóptero.

[00152] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico da invenção pode compreender pelo menos uma (por exemplo, uma, duas, três, ou mais) sequência de DNA capaz de ser expressada como uma molécula de iRNA em uma célula ou micro-organismo para inibir a expressão de gene alvo em uma célula, tecido, ou órgão de uma praga de coleóptero. Tal(is) sequência(s) de DNA podem ser operavelmente ligadas a uma sequência promotora que funciona em uma célula compreendendo a molécula de DNA para iniciar ou realçar a transcrição da(s) molécula(s) de dsRNA codificada(s). Em uma modalidade, o pelo menos uma (por exemplo, uma, duas, três, ou mais) sequência de DNA pode ser derivada da SEQ ID NO: 3. Derivados da SEQ ID NO: 3 incluem fragmentos da SEQ ID NO: 3. Em algumas modalidades, um fragmento da SEQ ID NO: 3 pode compreender, por exemplo, pelo menos cerca de 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 9, ou seu complemento. Assim, um fragmento da SEQ ID NO: 3 pode compreender, por exemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3, ou um complemento deste, e compreender toda ou parte da SEQ ID NO: 9, ou seu complemento. Nestas e outras modalidades, um fragmento da SEQ ID NO: 3 pode compreender, por exemplo, mais do que cerca de 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3, ou um complemento deste. Assim, um fragmento da SEQ ID NO: 3 pode compreender, por exemplo, 19, 20, 21, cerca de 25 (por exemplo, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, e 29), cerca de 30, cerca de 40 (por exemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, e 45), cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90, cerca de 100, cerca de 110, cerca de 120, cerca de 130, cerca de 140, cerca de 150, cerca de 160, cerca de 170, cerca de 180, cerca de 190, cerca de 200, ou mais nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3, ou um complemento deste, e compreender toda ou parte da SEQ ID NO: 9, ou seu complemento.

[00153] Em modalidades particulares, pelo menos uma sequência de DNA capaz de ser expressada como uma molécula de iRNA em uma célula ou micro-organismo para inibir a expressão de gene alvo em uma célula, tecido, ou órgão de uma praga de coleóptero pode compreender ainda sequência(s) de DNA que são derivadas de uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo compreendendo as SEQ ID NOs: 1, 2, e 4. Derivados de uma sequência de nucleotídeo selecionados do grupo compreendendo as SEQ ID NOs: 1, 2, e 4 incluem fragmentos de uma ou mais das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4. Em algumas modalidades, um fragmento de uma ou mais das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4 pode compreender, por exemplo, pelo menos cerca de 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4, ou um complemento destas. Assim, um fragmento de uma ou mais das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4 pode compreender, por exemplo, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das sequências nas SEQ ID NOs: 1, 2, e 4, ou um complemento destas. Nestas e outras modalidades, um fragmento de uma ou mais das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4 pode compreender, por exemplo, mais do que cerca de 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4, ou um complemento destas. Assim, um fragmento de uma ou mais das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4 pode compreender, por exemplo, 19, 20, 21, cerca de 25 (por exemplo, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, e 29), cerca de 30, cerca de 40 (por exemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, e 45), cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90, cerca de 100, cerca de 110, cerca de 120, cerca de 130, cerca de 140, cerca de 150, cerca de 160, cerca de 170, cerca de 180, cerca de 190, cerca de 200, ou mais nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4, ou um complemento destas.

[00154] Algumas modalidades compreendem introduzir moléculas

de dsRNA parcial ou completamente estabilizadas em uma praga de coleóptero para inibir a expressão de um gene alvo em uma célula, tecido, ou órgão da praga de coleóptero. Quando expressadas como uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) e absorvidas por uma praga de coleóptero, sequências de ácido nucleico compreendendo um ou mais fragmentos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 4 podem causar uma ou mais de morte, inibição do crescimento, mudança na relação entre os sexos, redução no tamanho da prole, cessação da infecção, e/ou cessação da alimentação por uma praga de coleóptero. Por exemplo, em algumas modalidades, uma molécula de dsRNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo incluindo cerca de 19 a cerca de 300 nucleotídeos que são substancialmente homólogos a uma sequência de gene alvo de praga de coleóptero e compreendendo a SEQ ID NO: 3 ou toda ou parte da SEQ ID NO: 9 é fornecida. Exemplos específicos de moléculas de dsRNA compreendendo pelo menos uma sequência de nucleotídeo que é substancialmente homóloga a uma sequência de gene alvo de praga de coleóptero e compreendendo a SEQ ID NO: 3 ou toda ou parte da SEQ ID NO: 9 pode ser, sem limitação, pelo menos 19, 20, 21, cerca de 25 (por exemplo, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, e 29), cerca de 30, cerca de 40 (por exemplo, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, e 45), cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90, cerca de 100, cerca de 110, cerca de 120, cerca de 130, cerca de 140, cerca de 150, cerca de 160, cerca de 170, cerca de 180, cerca de 190, cerca de 200, ou mais nucleotídeos em comprimento. Tais moléculas de dsRNA podem compreender ainda um ou mais fragmentos das SEQ ID NOs: 1, 2, e/ou 4. A expressão de uma tal molécula de dsRNA pode, por exemplo, levar à mortalidade em uma praga de coleóptero que absorve a molécula de dsRNA.

[00155] Em certas modalidades, moléculas de dsRNA fornecidas

pela invenção compreendem sequências de nucleotídeo complementares a um gene alvo compreendendo a SEQ ID NO: 3 e/ou sequências de nucleotídeo complementares a toda ou parte da SEQ ID NO: 9, a inibição das quais o gene alvo em uma praga de coleóptero resulta na redução ou remoção de um agente de sequência de proteína ou nucleotídeo que é essencial para o crescimento, desenvolvimento, ou outra função biológica da praga de coleóptero. Uma sequência de nucleotídeo selecionada pode exibir de cerca de 80 % a cerca de 100 % de identidade de sequência à SEQ ID NO: 3; um fragmento contíguo da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 3 compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; ou o complemento de qualquer um do precedente. Por exemplo, uma sequência de nucleotídeo selecionada pode exibir cerca de 81%; cerca de 82%; cerca de 83%; cerca de 84%; cerca de 85%; cerca de 86%; cerca de 87%; cerca de 88%; cerca de 89%; cerca de 90%; cerca de 91%; cerca de 92%; cerca de 93%; cerca de 94% cerca de 95%; cerca de 96%; cerca de 97%; cerca de 98%; cerca de 98,5%; cerca de 99%; cerca de 99,5%; ou cerca de 100% de identidade de sequência à SEQ ID NO: 3; um fragmento contíguo da sequência de nucleotídeo apresentada na SEQ ID NO: 3 compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; ou o complemento de qualquer um do precedente. Em modalidades particulares, uma molécula de dsRNA fornecida pela invenção pode compreender ainda uma ou mais sequências de nucleotídeo complementares a um gene alvo compreendendo uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4, a inibição das quais o gene alvo em uma praga de coleóptero resulta na redução ou remoção de um agente de sequência de proteína ou nucleotídeo que é essencial para o crescimento, desenvolvimento, ou outra função biológica da praga de coleóptero.

[00156] Em algumas modalidades, uma molécula de DNA capaz de ser expressada como uma molécula de iRNA em uma célula ou micro-

organismo para inibir a expressão de gene alvo pode compreender uma única sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a toda ou parte de uma sequência de ácido nucleico nativa encontrada em uma ou mais espécies de praga de coleóptero alvos, ou a molécula de DNA pode ser construída como um quimera a partir de uma pluralidade de tais sequências especificamente complementares.

[00157] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico pode compreender uma primeira e uma segunda sequência de nucleotídeo separada por uma "sequência espaçadora." Uma sequência espaçadora pode ser uma região compreendendo qualquer sequência de nucleotídeos que facilita a formação de estrutura secundária entre a primeira e segunda sequências de nucleotídeo, onde isto é desejado. Em uma modalidade, a sequência espaçadora é parte de uma sequência de codificação senso ou antissenso para mRNA. A sequência espaçadora pode compreender alternativamente qualquer combinação de nucleotídeos ou homólogos destes que são capazes de ser ligados covalentemente a uma molécula de ácido nucleico.

[00158] Por exemplo, em algumas modalidades, a molécula de DNA pode compreender uma sequência de nucleotídeo que codifica uma ou mais moléculas de RNA diferentes, em que cada uma das moléculas de RNA diferentes compreende uma primeira sequência de nucleotídeo e uma segunda sequência de nucleotídeo, em que a primeira e segunda sequências de nucleotídeo são complementares entre si. A primeira e segunda sequências de nucleotídeo podem ser conectadas dentro de uma molécula de RNA por uma sequência espaçadora. A sequência espaçadora pode constituir parte da primeira sequência de nucleotídeo ou da segunda sequência de nucleotídeo. A expressão de uma molécula de RNA compreendendo a primeira e segunda sequências de nucleotídeo pode levar à formação de uma molécula de dsRNA da presente invenção, por hibridização específica da

primeira e segunda sequências de nucleotídeo. A primeira sequência de nucleotídeo ou a segunda sequência de nucleotídeo pode ser substancialmente idêntica a uma sequência de ácido nucleico nativa a uma praga de coleóptero (por exemplo, um gene alvo, ou sequência que não de codificação transcrita), um derivado desta, ou uma sequência complementar a esta.

[00159] Moléculas de ácido nucleico de dsRNA compreendem fitas duplas de sequências de ribonucleotídeo polimerizadas, e podem incluir modificações à cadeia principal de fosfato-açúcar ou ao nucleosídeo. Modificações na estrutura de RNA podem ser adaptadas para permitir a inibição específica. Em uma modalidade, moléculas de dsRNA podem ser modificadas através de um processo enzimático ubíquo de modo que moléculas de siRNA possam ser geradas. Este processo enzimático pode utilizar uma enzima de RNase III, tal como DICER em eucariotas, *in vitro* ou *in vivo*. Ver Elbashir *et al.* (2001) Nature 411:494-8; e Hamilton e Baulcombe (1999) Science 286(5441):950-2. DICER ou enzimas de RNase III funcionalmente equivalentes clivam fitas de dsRNA e/ou moléculas de hpRNA maiores nos oligonucleotídeos menores (por exemplo, siRNAs), cada um dos quais é cerca de 19 a 25 nucleotídeos em comprimento. As moléculas de siRNA produzidas por estas enzimas têm 2 a 3 projeções 3' de nucleotídeo, e terminos 5' de fosfato e 3' de hidroxila. As moléculas de siRNA geradas por enzimas de RNase III são desenroladas e separadas em RNA de fita única na célula. As moléculas de siRNA depois especificamente hibridizam com sequências de RNA transcritas a partir de um gene alvo, e ambas as moléculas de RNA são subsequentemente degradadas por um mecanismo de degradação de RNA celular inerente. Este processo pode resultar na degradação ou remoção eficaz da sequência de RNA codificada pelo gene alvo no organismo alvo. O resultado é o silenciamento pós-transcricional do gene alvejado. Em algumas moda-

lidades, moléculas de siRNA produzidas por enzimas de RNAse III endógenas de moléculas de ácido nucleico heterólogas podem mediar eficientemente a infrarregulação de genes alvos em pragas de coleópteros.

[00160] Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico da invenção pode incluir pelo menos uma sequência de nucleotídeo que não ocorre naturalmente que pode ser transcrita em uma molécula de RNA de fita única capaz de formar uma molécula de dsRNA *in vivo* através de hibridização intermolecular. Tais sequências de dsRNA tipicamente de auto-agregam, e podem ser fornecidas na fonte de nutrição de uma praga de coleóptero para obter a inibição pós-transcricional de um gene alvo. Nestas e outras modalidades, uma molécula de ácido nucleico da invenção pode compreender duas sequências de nucleotídeo que não ocorrem naturalmente diferentes, cada uma das quais é especificamente complementar a um gene alvo diferente em uma praga de coleóptero. Quando uma tal molécula de ácido nucleico é fornecida como uma molécula de dsRNA a uma praga de coleóptero, a molécula de dsRNA inibe a expressão de pelo menos dois genes alvos diferentes na praga de coleóptero.

C. Obtenção de moléculas de ácido nucleico

[00161] Uma variedade de sequências nativas em pragas de coleópteros pode ser usada como sequências alvos para o projeto de moléculas de ácido nucleico da invenção, tais como iRNAs e moléculas de DNA que codificam iRNAs. A seleção de sequências nativas não é, entretanto, um processo arriscado. Apenas um pequeno número de sequências nativas na praga de coleóptero serão alvos eficazes. Por exemplo, isto não pode ser prognosticado com certeza se uma sequência nativa particular pode ser efetivamente infrarregulada por moléculas de ácido nucleico da invenção, ou se a infrarregulação de uma sequência nativa particular terá um efeito prejudicial sobre o cresci-

mento, viabilidade, proliferação, e/ou reprodução da praga de coleóptero. A vasta maioria de sequências de praga de coleóptero nativas, tais como ESTs isolados destas (por exemplo, como listado na Patente U.S. 7.612.194 e Patente US 7.943.819), não tem um efeito prejudicial sobre o crescimento, viabilidade, proliferação, e/ou reprodução da praga de coleóptero, tal como WCR ou NCR. Nem é prognosticável que das sequências nativas que podem ter um efeito prejudicial sobre uma praga de coleóptero são capazes de ser usadas em técnicas recombinantes para expressar moléculas de ácido nucleico complementares a tais sequências nativas em uma planta hospedeira e fornecer o efeito prejudicial sobre a praga de coleóptero na alimentação sem causar dano à planta hospedeira.

[00162] Em algumas modalidades, moléculas de ácido nucleico da invenção (por exemplo, moléculas de dsRNA a ser fornecidas na planta hospedeira de uma praga de coleóptero) são selecionadas para sequências alvos de cDNA que codificam proteínas ou partes de proteínas essenciais para a sobrevivência da praga de coleóptero, tais como sequências de aminoácido envolvidas em vias bioquímicas metabólicas ou catabólicas, divisão celular, reprodução, metabolismo de energia, digestão, parasitismo e semelhantes. Como descrito aqui, a ingestão de composições por um organismo alvo contendo um ou mais dsRNAs, pelo menos um segmento dos quais é especificamente complementar o pelo menos um segmento substancialmente idêntico de RNA produzido nas células do patógeno alvo, pode resultar na morte ou outra inibição do alvo. Uma sequência de nucleotídeo, DNA ou RNA, derivada de uma praga de coleóptero pode ser usada para construir células de plantas resistentes à infestação pelas pragas de coleópteros. A planta hospedeira da praga de coleóptero (por exemplo, *Z. mays* ou *G. max*), por exemplo, pode ser transformada para conter uma ou mais das sequências de nucleotídeo derivadas da praga de

coleóptero como fornecido aqui. A sequência de nucleotídeo transformada no hospedeiro pode codificar um ou mais RNAs que se formam em uma sequência de dsRNA nas células ou fluidos biológicos dentro do hospedeiro transformado, tornando assim o dsRNA disponível se/quando a praga de coleóptero forma uma relação nutricional com o hospedeiro transgênico. Isto pode resultar na supressão da expressão de um ou mais genes nas células da praga de coleóptero, e basicamente morte ou inibição de seu crescimento ou desenvolvimento.

[00163] Assim, em algumas modalidades, um gene é alvo que é essencialmente envolvido no crescimento, desenvolvimento e reprodução de uma praga de coleóptero. Outros genes alvos para uso na presente invenção podem incluir, por exemplo, aqueles que desempenham papéis importantes na viabilidade, movimento, migração, crescimento, desenvolvimento, infectividade, estabelecimento de praga de coleóptero de sítios de alimentação e reprodução. Um gene alvo portanto pode ser um gene constitutivo ou um fator de transcrição. Adicionalmente, uma sequência de nucleotídeo de praga de coleóptero nativa para uso na presente invenção também pode ser derivada de um homólogo (por exemplo, um ortólogo), de um gene vegetal, viral, bacteriano ou de inseto, a função do qual é conhecida àqueles de habilidade na técnica, e a sequência de nucleotídeo do qual é especificamente hibridizável com um gene alvo no genoma da praga de coleóptero alvo. Métodos de identificar um homólogo de um gene com uma sequência de nucleotídeo conhecida por hibridização são conhecidos àqueles de habilidade na técnica.

[00164] Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos para obter uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo para produzir uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA). Uma tal modalidade compreende: (a) analisar um ou mais genes alvos quanto à sua ex-

pressão, função, e fenótipo na supressão de gene mediada por dsRNA em uma praga de coleóptero; (b) sondar uma biblioteca de cDNA ou gDNA com uma sonda compreendendo toda ou uma porção de uma sequência de nucleotídeo ou um homólogo desta a partir de uma praga de coleóptero alvejada que exibe um fenótipo de crescimento ou desenvolvimento alterado (por exemplo, reduzido) em uma análise de supressão mediada por dsRNA; (c) identificar um clone de DNA que especificamente hibridiza com a sonda; (d) isolar o clone de DNA identificado na etapa (b); (e) sequenciar o fragmento de cDNA ou gDNA que compreende o clone isolado na etapa (d), em que a molécula de ácido nucleico sequenciada transcreve toda ou uma porção substancial da sequência de RNA ou um homólogo desta; e (f) quimicamente sintetizar toda ou uma porção substancial de uma sequência de gene, ou um siRNA ou miRNA ou hpRNA ou mRNA ou dsRNA.

[00165] Em outras modalidades, um método para obter um fragmento de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo para produzir uma porção substancial de uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) inclui: (a) sintetizar os primeiro e segundo iniciadores de oligonucleotídeo especificamente complementares a uma porção de uma sequência de nucleotídeo nativa a partir de uma praga de coleóptero alvejada; e (b) ampliar uma inserção de cDNA ou gDNA presente em um vetor de clonagem usando os primeiro e segundo iniciadores de oligonucleotídeo da etapa (a), em que a molécula de ácido nucleico ampliada transcreve uma porção substancial de uma molécula de siRNA ou miRNA ou hpRNA ou mRNA ou dsRNA.

[00166] Ácidos nucleicos da invenção podem ser isolados, ampliados, ou produzidos por vários métodos. Por exemplo, uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) pode ser obtida por ampliação por PCR de uma sequência de ácido nucleico alvo (por

exemplo, um gene alvo ou uma sequência que não de codificação alvo transcrita) derivada de uma biblioteca de gDNA ou cDNA, ou porções desta. DNA ou RNA podem ser extraídos de um organismo alvo, e bibliotecas de ácido nucleico podem ser preparadas destes usando métodos conhecidos àqueles comumente habilitados na técnica por exemplo, bibliotecas de DNA ou cDNA geradas de um organismo alvo podem ser usadas para a ampliação por PCR e sequenciamento de genes alvos. Um produto de PCR confirmado pode ser usado como um padrão para transcrição *in vitro* para gerar RNA senso e antissenso com promotores mínimos. Alternativamente, moléculas de ácido nucleico podem ser sintetizadas por qualquer uma de várias técnicas (Ver, por exemplo, Ozaki *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research*, 20: 5205-5214; e Agrawal *et al.* (1990) *Nucleic Acids Research*, 18: 5419-5423), incluindo o uso de um sintetizador de DNA automático (por exemplo, um Sintetizador de DNA/RNA da P.E. Biosystems, Inc. (Foster City, Calif.) modelo 392 ou 394), usando química padrão, tal como química de fosforamidita. Ver, por exemplo, Beaucage *et al.* (1992) *Tetrahedron*, 48: 2223-2311; Patentes U.S. 4.980.460, 4.725.677, 4.415.732, 4.458.066, e 4.973.679. Química alternativa que resulta em grupos de cadeia principal não naturais, tais como fosforotioato, fosforamidato, e semelhantes, também pode ser utilizada.

[00167] Uma molécula de RNA, dsRNA, siRNA, miRNA, ou hpRNA da presente invenção pode ser produzida quimicamente ou enzimaticamente por uma pessoa habilitada na técnica através de reações manuais ou automáticas, ou *in vivo* em uma célula compreendendo uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência que codifica a molécula de RNA, dsRNA, siRNA, miRNA, ou hpRNA. RNA também pode ser produzido por síntese orgânica parcial ou total - qualquer ribonucleotídeo modificado pode ser introduzido por síntese enzimática ou orgânica *in vitro*. Uma molécula de RNA pode ser sinte-

tizada por uma RNA polimerase celular ou uma RNA polimerase de bacteriófago (por exemplo, RNA polimerase de T3, RNA polimerase de T7, e RNA polimerase de SP6). Construções de expressão úteis para a clonagem e expressão de sequências de nucleotídeo são conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Publicação PCT Internacional Nº WO 97/32016; e Patentes U.S. 5.593.874, 5.698.425, 5.712.135, 5.789.214, e 5.804.693. Moléculas de RNA que são sintetizadas quimicamente ou por síntese enzimática *in vitro* podem ser purificadas antes da introdução em uma célula. Por exemplo, moléculas de RNA podem ser purificadas de uma mistura por extração com um solvente ou resina, precipitação, eletroforese, cromatografia, ou uma combinação destes. Alternativamente, moléculas de RNA que são sintetizadas quimicamente ou por síntese enzimática *in vitro* podem ser usadas sem nenhuma ou um mínimo de purificação, por exemplo, para evitar perdas devido ao processamento da amostra. As moléculas de RNA podem ser secas para armazenamento ou dissolvidas em uma solução aquosa. A solução pode conter tampões ou sais para promover recostamento, e/ou estabilização de fitas duplas de molécula de dsRNA.

[00168] Em modalidades, uma molécula de dsRNA pode ser formada por uma única fita de RNA autocomplementar ou a partir de duas fitas de RNA complementares. Moléculas de dsRNA podem ser sintetizadas *in vivo* ou *in vitro*. Uma RNA polimerase endógena da célula pode mediar a transcrição de a uma ou duas fitas de RNA *in vivo*, ou RNA polimerase clonada pode ser usada para mediar a transcrição *in vivo* ou *in vitro*. A inibição pós-transcricional de um gene alvo em uma praga de coleóptero pode ser alvejada no hospedeiro por transcrição específica em um tipo de órgão, tecido, ou célula do hospedeiro (por exemplo, usando-se um promotor específico de tecido); estimulação de uma condição ambiental no hospedeiro (por exemplo, usando-se um promotor induzível que é responsivo à infecção, estresse, tempera-

tura, e/ou indutores químicos); e/ou transcrição de engenharia em um estágio de desenvolvimento ou idade do hospedeiro (por exemplo, usando-se um promotor específico do estágio de desenvolvimento). Fitas de RNA que formam uma molécula de dsRNA, se transcritas *in vitro* ou *in vivo*, podem ser ou não poliadeniladas, e podem ser ou não capazes de ser traduzidas em um polipeptídeo por um aparelho de tradução da célula.

D. Vetores recombinantes e transformação da célula hospedeira

[00169] Em algumas modalidades, a invenção também fornece uma molécula de DNA para introdução em uma célula (por exemplo, um célula bacteriana, uma célula de levedura, ou uma célula de planta), em que a molécula de DNA compreende uma sequência de nucleotídeo que, na expressão ao RNA e ingestão por uma praga de coleóptero, obtém supressão de um gene alvo em uma célula, tecido, ou órgão da praga de coleóptero. Assim, algumas modalidades fornecem uma molécula de ácido nucleico recombinante compreendendo uma sequência de ácido nucleico capaz de ser expressada como uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) em uma célula de planta para inibir a expressão de gene alvo em uma praga de coleóptero. De modo a iniciar ou realçar a expressão, tais moléculas de ácido nucleico recombinantes podem compreender uma ou mais sequências reguladoras, sequências reguladoras estas que podem ser operavelmente ligadas à sequência de ácido nucleico capaz de ser expressada como um iRNA. Métodos para expressar uma molécula de supressão de gene em plantas são conhecidos, e podem ser usados para expressar uma sequência de nucleotídeo da presente invenção. Ver, por exemplo, Publicação PCT Internacional Nº WO06073727; e Publicação de Patente U.S. Nº 2006/0200878 A1)

[00170] Em modalidades específicas, uma molécula de DNA re-

combinante da invenção pode compreender uma sequência de ácido nucleico que codifica uma molécula de dsRNA. Tais moléculas de DNA recombinantes podem codificar moléculas de dsRNA capazes de inibir a expressão de gene(s) alvo(s) endógeno(s) em uma célula de praga de coleóptero na ingestão. Em muitas modalidades, uma molécula de dsRNA transcrita pode ser fornecida em uma forma estabilizada; por exemplo, como uma estrutura de grampo de cabelo e haste e alça.

[00171] Nestas e outras modalidades, uma fita de uma molécula de dsRNA pode ser formada por transcrição de uma sequência de nucleotídeo que é substancialmente homóloga a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 9; o complemento da SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; o complemento da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; o complemento da SEQ ID NO: 11; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* (por exemplo, WCR) compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; o complemento de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabroti-*

ca compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9.

[00172] Uma fita de uma molécula de dsRNA também pode ser formada por transcrição de uma sequência de nucleotídeo que é substancialmente homóloga a uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 1; o complemento da SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; o complemento da SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; o complemento da SEQ ID NO: 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* (por exemplo, WCR) compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; um fra-

gmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4.

[00173] Em modalidades particulares, uma molécula de DNA recombinante que codifica uma molécula de dsRNA pode compreender pelo menos duas sequências de nucleotídeo com uma sequência de codificação arranjada tal que uma sequência de nucleotídeo está em uma orientação senso, e a outra sequência de nucleotídeo está em uma orientação antissenso, em relação o pelo menos um promotor, em que a sequência de nucleotídeo senso e a sequência de nucleotídeo antissenso são ligadas ou conectadas por uma sequência espaçadora de cerca de cinco (~5) a cerca de mil (~1000) nucleotídeos. A sequência espaçadora pode formar uma alça entre as sequências senso e antissenso. A sequência de nucleotídeo senso ou a sequência de nucleotídeo antissenso pode ser substancialmente homóloga à sequência de nucleotídeo de um gene alvo (por exemplo, um gene compreendendo uma das SEQ ID NOs: 1 a 4) ou fragmento deste. Em algumas modalidades, entretanto, uma molécula de DNA recombinante pode codificar uma molécula de dsRNA sem uma sequência espaçadora.

dora. Em modalidades, uma sequência de codificação senso e um sequência de codificação antissenso pode ser de comprimentos diferentes.

[00174] Sequências identificadas como tendo um efeito deletério sobre pragas de coleópteros ou um efeito protetivo de planta com referência a pragas de coleópteros podem ser facilmente incorporadas em moléculas de dsRNA expressadas através da geração de cassetes de expressão apropriados em uma molécula de ácido nucleico recombinante da invenção. Por exemplo, tais sequências podem ser expressadas como um grampo de cabelo com estrutura de haste e alça tomando-se um primeiro segmento correspondendo a uma sequência de gene alvo (por exemplo, SEQ ID NO: 3 e sequências compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 5); ligando esta sequência a uma segunda região espaçadora de segmento que não é homóloga ou complementar ao primeiro segmento; e ligando-se esta a um terceiro segmento, em que pelo menos uma porção do terceiro segmento é substancialmente complementar ao primeiro segmento. Uma tal construção forma uma estrutura de haste e alça por hibridização do primeiro segmento com o terceiro segmento, em que a estrutura de alça se forma compreendendo o segundo segmento. *Ver*, por exemplo, Publicações de Patentes U.S. Nos. US 2002/0048814 e US 2003/0018993; e Publicações PCT Internacionais Nos. WO94/01550 e WO98/05770. Uma molécula de dsRNA pode ser gerada, por exemplo, na forma de uma estrutura de fita dupla tal como uma estrutura de haste-alça (por exemplo, grampo de cabelo), por meio da qual a produção do siRNA alvejado para uma sequência de praga de coleóptero nativa é realçada por coexpressão de um fragmento do gene alvejado, por exemplo em um cassete expressível em planta adicional, que leva à produção de siRNA realçada, ou reduz a metilação para impedir o silenciamento de gene transcricional do promotor do tipo grampo de cabelo de dsRNA.

[00175] Modalidades da invenção incluem a introdução de uma molécula de ácido nucleico recombinante da presente invenção em uma planta (isto é, transformação) para obter níveis inibitórios de praga de coleóptero de expressão de uma ou mais moléculas de iRNA. Uma molécula de DNA recombinante pode, por exemplo, ser um vetor, tal como um plasmídeo linear ou um circular fechado. O sistema de vetor pode ser um único vetor ou plasmídeo, ou dois ou mais vetores ou plasmídeos que juntos contêm o DNA total a ser introduzido no genoma de um hospedeiro. Além disso, um vetor pode ser um vetor de expressão. Sequências de ácido nucleico da invenção podem, por exemplo, ser adequadamente inseridas em um vetor sob o controle de um promotor adequado que funciona em um ou mais hospedeiros para conduzir a expressão de uma sequência de codificação ligada ou outra sequência de DNA. Muitos vetores estão disponíveis para este propósito, e a seleção do vetor apropriado dependerá principalmente do tamanho do ácido nucleico a ser inserido no vetor e da célula hospedeira particular a ser transformada com o vetor. Cada vetor contém vários componentes dependendo de sua função (por exemplo, ampliação de DNA ou expressão de DNA) e da célula hospedeira particular com a qual ele é compatível.

[00176] Para comunicar resistência à praga de coleóptero a uma planta transgênica, um DNA recombinante pode, por exemplo, ser transcrito em uma molécula de iRNA (por exemplo, uma molécula de RNA que forma uma molécula de dsRNA) dentro dos tecidos ou fluidos da planta recombinante. Uma molécula de iRNA pode compreender uma sequência de nucleotídeo que é substancialmente homóloga e especificamente hibridizável a uma sequência de nucleotídeo transcrita correspondente dentro de uma praga de coleóptero que pode alimentar-se das espécies de planta hospedeira. a praga de coleóptero pode contatar a molécula de iRNA que é transcrita em células da plan-

ta hospedeira transgênica, por exemplo, ingerindo-se células ou fluidos da planta hospedeira transgênica que compreende a molécula de iRNA. Assim, a expressão de um gene alvo é suprimida pela molécula de iRNA dentro de pragas de coleópteros que infestam a planta hospedeira transgênica. Em algumas modalidades, a supressão da expressão do gene alvo na praga de coleóptero alvo pode resultar na planta sendo resistente à praga.

[00177] De modo a permitir a liberação de moléculas de iRNA a uma praga de coleóptero em uma relação nutricional com uma célula de planta que foi transformada com uma molécula de ácido nucleico recombinante da invenção, a expressão (isto é, transcrição) das moléculas de iRNA na célula de planta é necessária. Assim, uma molécula de ácido nucleico recombinante pode compreender uma sequência de nucleotídeo da invenção operavelmente ligada a uma ou mais sequências reguladoras, tal como uma sequência promotora heteróloga que funciona em uma célula hospedeira, tal como uma célula bacteriana em que a molécula de ácido nucleico deve ser ampliada, ou uma célula de planta em que a molécula de ácido nucleico deve ser expressada.

[00178] Promotores adequados para uso em moléculas de ácido nucleico da invenção incluem aqueles que são induzíveis, virais, sintéticos, ou constitutivos, todos os quais são bem conhecidos na técnica. Exemplos não limitantes que descrevem tais promotores incluem Patentes U.S. Nos. 6.437.217 (promotor de RS81 do milho); 5.641.876 (promotor de actina do arroz); 6.426.446 (promotor de RS324 do milho); 6.429.362 (promotor de PR-1 do milho); 6.232.526 (promotor de A3 do milho); 6.177.611 (promotores do milho constitutivos); 5.322.938, 5.352.605, 5.359.142, e 5.530.196 (promotor de 35S); 6.433.252 (promotor de oleosina L3 do milho); 6.429.357 (promotor de actina 2 do arroz, e íntron de actina 2 do arroz); 6.294.714 (promotores

induzíveis por luz); 6.140.078 (promotores induzíveis por sal); 6.252.138 (promotores induzíveis por patógeno); 6.175.060 (promotores induzíveis por deficiência de fósforo); 6.388.170 (promotores bidirecionais); 6.635.806 (promotor de gama-coixina); e Pedido de Patente U.S. Serial Nº 09/757.089 (promotor de cloroplasto aldolase do milho). Promotores adicionais incluem o promotor de nopalina sintase (NOS) (Ebert *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(16):5745-9) e o promotor de octopina sintase (OCS) (ambos os quais são carregados em plasmídeos indutores de tumor de *Agrobacterium tumefaciens*); os promotores de caulimovírus tal como o promotor 19S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) (Lawton *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-24); o promotor 35S de CaMV (Odell *et al.* (1985) Nature 313:810-2; o promotor 35S do vírus do mosaico da escrofulária (Walker *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(19):6624-8); o promotor de sacarose sintase (Yang e Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-8); o promotor do complexo de gene R (Chandler *et al.* (1989) Plant Cell 1:1175-83); o promotor de gene de proteína de ligação a/b de clorofila; CaMV35S (Patentes U.S. Nos. 5.322.938, 5.352.605, 5.359.142, e 5.530.196); FMV35S (Patentes U.S. Nos. 6.051.753, e 5.378.619); um promotor de PC1SV (Patente U.S. Nº 5.850.019); o promotor de SCP1 (Patente U.S. Nº 6.677.503); e promotores de AGR-tu.nos (Acesso no GenBank Nº V00087; Depicker *et al.* (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1:561-73; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7).

[00179] Em modalidades particulares, moléculas de ácido nucleico da invenção compreendem um promotor específico de tecido, tal como um promotor específico da raiz. Promotores específicos da raiz conduzem a expressão de sequências operavelmente ligadas exclusivamente ou preferencialmente no tecido radicular. Exemplos de promotores específicos da raiz são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Patentes U.S. 5.110.732; 5.459.252 e 5.837.848; e Opperman *et al.*

(1994) *Science* 263:221-3; e Hirel *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 20:207-18. Em algumas modalidades, uma sequência ou fragmento de nucleotídeo para controle de praga de coleóptero de acordo com a invenção podem ser clonados entre dois promotores específicos da raiz, que são operáveis em uma célula de planta transgênica e expressados nesta para produzir moléculas de RNA na célula de planta transgênica que subsequentemente podem formar moléculas de dsRNA, como descrito, *supra*. As moléculas de iRNA expressadas em tecidos da planta podem ser ingeridas por uma praga de coleóptero de modo que a supressão da expressão de gene alvo seja obtida.

[00180] Sequências reguladoras adicionais que podem ser opcionalmente operavelmente ligadas a uma molécula de ácido nucleico de interesse incluem 5' UTRs localizados entre uma sequência promotora e uma sequência de codificação que funcionam como uma sequência líder de tradução. A sequência líder de tradução está presente no mRNA completamente processado, e ela pode afetar o processamento do transcrito primário, e/ou estabilidade do RNA. Exemplos de sequências líderes de tradução incluem líderes de proteína de choque térmico de milho e petúnia (Patente U.S. Nº 5.362.865), líderes de proteína de revestimento viral de planta, líderes de rubisco de planta, e outros. *Ver*, por exemplo, Turner e Foster (1995) *Molecular Biotech.* 3(3):225-36. Exemplos não limitantes de 5' UTRs incluem GmHsp (Patente U.S. Nº 5.659.122); PhDnaK (Patente U.S. Nº 5.362.865); AtAnt1; TEV (Carrington e Freed (1990) *J. Virol.* 64:1590-7); e AGRtunos (Acesso no GenBank Nº V00087; e Bevan *et al.* (1983) *Nature* 304:184-7).

[00181] Sequências reguladoras adicionais que podem ser opcionalmente operavelmente ligadas a uma molécula de ácido nucleico de interesse também incluem sequências não traduzidas 3', regiões de terminação da transcrição 3', ou regiões de poliadenilação. Estes são

elementos genéticos localizados a jusante de uma sequência de nucleotídeo, e incluem polinucleotídeos que fornecem sinal de poliadenilação, e/ou outros sinais reguladores capazes de afetar a transcrição ou processamento de mRNA. O sinal de poliadenilação funciona em plantas para causar a adição de nucleotídeos de poliadenilato à extremidade 3' do precursor de mRNA. A sequência de poliadenilação pode ser derivada de uma variedade de genes de planta, ou de genes de T-DNA. Um exemplo não limitante de uma região de terminação da transcrição 3' é a região 3' de nopalina sintase (nos 3'; Fraley *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-7). Um exemplo do uso de regiões não traduzidas 3' diferentes é fornecido em Ingelbrecht *et al.*, (1989) Plant Cell 1:671-80. Exemplos não limitantes de sinais de poliadenilação incluem um de um gene RbcS2 de *Pisum sativum* (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi *et al.* (1984) EMBO J. 3:1671-9) e AGRtu.nos (Acesso no GenBank Nº E01312).

[00182] Algumas modalidades podem incluir um vetor de transformação de planta que compreende uma molécula de DNA isolada e purificada compreendendo pelo menos uma das sequências reguladoras descritas acima operativamente ligadas a uma ou mais sequências de nucleotídeo da presente invenção. Quando expressadas, a uma ou mais sequências de nucleotídeo resultam em uma ou mais moléculas de RNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar a toda ou parte de uma molécula de RNA nativa em uma praga de coleóptero. Assim, a(s) sequência(s) de nucleotídeo pode(m) compreender um segmento que codifica toda ou parte de uma sequência de ribonucleotídeo presente dentro de um transcrito de RNA alvejado por praga de coleóptero, e pode(m) compreender repetições invertidas de todo ou uma parte de um transcrito alvejado por praga de coleóptero. Um vetor de transformação de planta pode conter sequências especificamente complementares a mais do que uma se-

quência alvo, permitindo assim a produção de mais do que um dsRNA para inibir a expressão de dois ou mais genes em células de uma ou mais populações ou espécies de pragas de coleópteros alvos. Segmentos de sequência de nucleotídeo especificamente complementar às sequências de nucleotídeo presentes em genes diferentes podem ser combinados em uma única molécula de ácido nucleico compósita para a expressão em uma planta transgênica. Tais segmentos podem ser contíguos ou separados por uma sequência espaçadora.

[00183] Em algumas modalidades, um plasmídeo da presente invenção já contendo pelo menos uma sequência de nucleotídeo da invenção pode ser modificado pela inserção sequencial de sequência(s) de nucleotídeo adicional(is) no mesmo plasmídeo, em que a(s) sequência(s) de nucleotídeo adicional(is) são operavelmente ligadas aos mesmos elementos reguladores como a original pelo menos uma sequência de nucleotídeo. Em algumas modalidades, uma molécula de ácido nucleico pode ser designada para a inibição de genes alvos múltiplos. Em algumas modalidades, os genes múltiplos a serem inibidos podem ser obtidos das mesmas espécies de praga de coleóptero, que podem realçar a efetividade da molécula de ácido nucleico. Em outras modalidades, os genes podem ser derivados de pragas de coleópteros diferentes, que podem ampliar a faixa de pragas de coleópteros contra as quais o(s) agente(s) é/são eficaz(es). Quando genes múltiplos são alvejados para a supressão ou uma combinação de expressão e supressão, um elemento de DNA policistrônico pode ser fabricado.

[00184] Uma molécula ou vetor de ácido nucleico recombinante da presente invenção pode compreender um marcador selecionável que confere um fenótipo selecionável em uma célula transformada, tal como uma célula de planta. Marcadores selecionáveis também podem ser usados para selecionar plantas ou células de plantas que compreendem a molécula de ácido nucleico recombinante da invenção. O

marcador pode codificar resistência a biocida, resistência a antibiótico (por exemplo, canamicina, Geneticin (G418), bleomicina, higromicina, etc.), ou resistência a herbicida (por exemplo, glifosato, etc.). Exemplos de marcadores selecionáveis incluem, mas não são limitados a: um gene *neo* que codifica resistência à canamicina e pode ser selecionado para usar canamicina, G418, etc.; um gene *bar* que codifica resistência a bialafos; um gene de EPSP sintase mutante que codifica resistência a glifosato; um gene de nitrilase que confere resistência a bromoxinil; um gene de acetolactato sintase mutante (*ALS*) que confere resistência à imidazolinona ou sulfonilureia; e um gene de DHFR resistente a metotrexato. Marcadores selecionáveis múltiplos estão disponíveis que conferem resistência à ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, canamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, espectinomicina, rifampicina, estreptomina e tetraciclina, e semelhantes. Exemplos de tais marcadores selecionáveis são ilustrados, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5.550.318; 5.633.435; 5.780.708 e 6.118.047.

[00185] Uma molécula ou vetor de ácido nucleico recombinante da presente invenção também pode incluir um marcador triável. Marcadores triáveis podem ser usados para monitorar a expressão. Marcadores triáveis exemplares incluem um gene de β -glicuronidase ou *uidA* (GUS) que codifica uma enzima para a qual vários substratos cromogênicos são conhecidos (Jefferson *et al.* (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405); um gene de loco R, que codifica um produto que regula a produção de pigmentos de antocianina (cor vermelha) em tecidos da planta (Dellaporta *et al.* (1988) "Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*." Em 18th Stadler Genetics Symposium, P. Gustafson e R. Appels, eds. (New York: Plenum), pp. 263-82); um gene de β -lactamase (Sutcliffe *et al.* (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-41); um gene que codifica uma enzima para a qual

vários substratos cromogênicos são conhecidos (por exemplo, PADAC, uma cefalosporina cromogênica); um gene de luciferase (Ow *et al.* (1986) *Science* 234:856-9); um gene *xyIE* que codifica uma catecol dioxigenase que pode converter catecóis cromogênicos (Zukowski *et al.* (1983) *Gene* 46(2-3):247-55); um gene de amilase (Ikata *et al.* (1990) *Bio/Technol.* 8:241-2); um gene de tirosinase que codifica uma enzima capaz de oxidar tirosina a DOPA e dopaquinona que por sua vez condensa à melanina (Katz *et al.* (1983) *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-14); e uma α -galactosidase.

[00186] Em algumas modalidades, moléculas de ácido nucleico recombinantes, como descrito, *supra*, podem ser usadas em métodos para a geração de plantas transgênicas e expressão de ácidos nucleicos heterólogos em plantas para preparar plantas transgênicas que exibem suscetibilidade reduzida a pragas de coleópteros. Vetores de transformação de planta podem ser preparados, por exemplo, inserindo-se moléculas de ácido nucleico que codificam moléculas de iRNA em vetores de transformação de planta e introduzindo-se estes nas plantas.

[00187] Métodos adequados para a transformação de células hospedeiras incluem qualquer método pelo qual o DNA pode ser introduzido em uma célula, tal como por transformação de protoplastas (*Ver*, por exemplo, Patente U.S. 5.508.184), por absorção de DNA mediada por dessecação/inibição (*Ver*, por exemplo, Potrykus *et al.* (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8), por eletroporação (*Ver*, por exemplo, Patente U.S. 5.384.253), por agitação com fibras de carboneto de silício (*Ver*, por exemplo, Patentes U.S. 5.302.523 e 5.464.765), por transformação mediada por *Agrobacterium* (*Ver*, por exemplo, Patentes U.S. 5.563.055; 5.591.616; 5.693.512; 5.824.877; 5.981.840; e 6.384.301) e por aceleração de partículas revestidas com DNA (*Ver*, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.015.580; 5.550.318; 5.538.880; 6.160.208;

6.399.861; e 6.403.865), etc. Técnicas que são particularmente úteis para transformar o milho são descritas, por exemplo, nas Patentes U.S. 7.060.876 e 5.591.616; e Publicação PCT Internacional WO 95/06722. Através da aplicação de técnicas tais como estas, as células de espécies virtualmente de qualquer grau podem ser estavelmente transformadas. Em algumas modalidades, o DNA transformante é integrado no genoma da célula hospedeira. No caso de espécies multicelulares, células transgênicas podem ser regeneradas em um organismo transgênico. Qualquer uma destas técnicas pode ser usada para produzir uma planta transgênica, por exemplo, compreendendo uma ou mais sequências de ácido nucleico que codificam uma ou mais moléculas de iRNA no genoma da planta transgênica.

[00188] O método mais amplamente utilizado para introduzir um vetor de expressão nas plantas é fundamentado no sistema de transformação natural de *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* são bactérias do solo patogênicas de plantas que geneticamente transformam células de plantas. Os plasmídeos Ti e Ri de *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes*, respectivamente, carregam genes responsáveis pela transformação genética da planta. Os plasmídeos Ti (indutores de tumor) contêm um segmento grande, conhecido como T-DNA, que é transferido a plantas transformadas. Um outro segmento do plasmídeo Ti, a região vir, é responsável pela transferência de T-DNA. A região de T-DNA é limitada por repetições terminais. Em vetores binários modificados, os genes indutores de tumor foram suprimidos, e as funções da região vir são utilizadas para transferir o DNA estranho limitado pelas sequências de limite de T-DNA. A região T também pode conter um marcador selecionável para a recuperação eficiente de plantas e células transgênicas, e um sítio de clonagem múltiplo para inserir sequências para a transferência tal como um dsRNA que codifica ácido nucleico.

[00189] Assim, em algumas modalidades, um vetor de transformação de planta é derivado de um plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* (Ver, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 4.536.475, 4.693.977, 4.886.937, e 5.501.967; e Patente Europeia EP 0 122 791) ou um plasmídeo Ri de *A. rhizogenes*. Vetores de transformação de planta adicionais incluem, por exemplo e sem limitação, aqueles descritos por Herrera-Estrella *et al.* (1983) Nature 303:209-13; Bevan *et al.* (1983) Nature 304:184-7; Klee *et al.* (1985) Bio/Technol. 3:637-42; e na Patente Europeia EP 0 120 516, e aqueles derivados de qualquer um do precedente. Outras bactérias tais como *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, e *Mesorhizobium* que interagem com plantas naturalmente podem ser modificadas para mediar a transferência de gene a várias plantas diversas. Estas bactérias simbióticas associadas à planta podem ser feitas competentes para a transferência de gene por aquisição tanto de um plasmídeo Ti desarmado e um vetor binário adequado.

[00190] Depois de fornecer DNA exógeno a células receptoras, células transformadas são geralmente identificadas para cultura adicional e regeneração da planta. De modo a melhorar a capacidade para identificar células transformadas, uma pessoa pode desejar utilizar um gene marcador selecionável ou triável, como previamente apresentado, com o vetor de transformação usado para gerar o transformante. No caso onde um marcador selecionável é usado, células transformadas são identificadas dentro da população de célula potencialmente transformada expondo-se as células a um agente ou agentes seletivos. No caso onde um marcador triável é usado, células podem ser triadas quanto à característica de gene marcador desejada.

[00191] Células que sobrevivem à exposição ao agente seletivo, ou células que foram registradas positivas em um ensaio de triagem, podem ser cultivadas em meios que suportam a regeneração de plantas. Em algumas modalidades, qualquer meio de cultura tecidual de planta

adequado (por exemplo, meios MS e N6) pode ser modificado incluindo-se outras substâncias, tais como reguladores de crescimento. O tecido pode ser mantido em um meio básico com reguladores de crescimento até que tecido suficiente esteja disponível para começar os esforços de regeneração da planta, ou seguindo rodadas repetidas de seleção manual, até que a morfologia do tecido seja adequada para a regeneração (por exemplo, pelo menos 2 semanas), depois transferido aos meios conducentes para a formação de broto. Culturas são transferidas periodicamente até que a formação de broto suficiente ocorresse. Uma vez que os brotos são formados, eles são transferidos aos meios conducentes para a formação de raiz. Uma vez que raízes suficientes são formadas, as plantas podem ser transferidas para o solo para o crescimento e maturação adicionais.

[00192] Para confirmar a presença de uma molécula de ácido nucleico de interesse (por exemplo, uma sequência de DNA que codifica uma ou mais moléculas de iRNA que inibem a expressão de gene alvo em uma praga de coleóptero) nas plantas regenerantes, uma variedade de ensaios pode ser realizada. Tais ensaios incluem, por exemplo: ensaios biológicos moleculares, tais como Southern e Northern blotting, PCR, e sequenciamento de ácido nucleico; ensaios bioquímicos, tais como detecção da presença de um produto de proteína, por exemplo, por meios imunológicos (ELISA e/ou Western blots) ou por função enzimática; ensaios de partes da planta, tais como ensaios em folhas ou raízes; e análise do fenótipo da planta regenerada inteira.

[00193] Eventos de integração podem ser analisados, por exemplo, por ampliação por PCR usando, por exemplo, iniciadores de oligonucleotídeo específicos para uma molécula de ácido nucleico de interesse. A genotipagem por PCR é entendida a incluir, mas não ser limitada a, ampliação por reação em cadeia de polimerase (PCR) de DNA genômico derivado do tecido do calo da planta hospedeira isolada prog-

nosticado para conter uma molécula de ácido nucleico de interesse integrada no genoma, seguido por clonagem padrão e análise de sequência de produtos de ampliação por PCR. Métodos de genotipagem por PCR foram bem descritos (por exemplo, Rios, G. *et al.* (2002) Planta J. 32:243-53) e podem ser aplicados ao DNA genômico derivado de qualquer espécie de planta (por exemplo, *Z. mays* ou *G. max*) ou tipo de tecido, incluindo culturas celulares.

[00194] Uma planta transgênica formada usando métodos de transformação dependente de *Agrobacterium* tipicamente contém uma única sequência de DNA recombinante inserida em um cromossomo. A única sequência de DNA recombinante é referida como um "evento transgênico" ou "evento de integração." Tais plantas transgênicas são hemizigotas para a sequência exógena inserida. Em algumas modalidades, um homocigoto de planta transgênica com respeito a um transgene pode ser obtido reproduzindo-se sexualmente (autopolinização) de uma planta transgênica segregante independente que contém uma única sequência de gene exógena à ela mesma, por exemplo uma planta F_0 , para produzir semente F_1 . Um quarto da semente F_1 produzida será homocigoto com respeito ao transgene. A germinação de semente F_1 resulta em plantas que podem ser testada quanto à heterocigosidade, tipicamente usando um ensaio de SNP ou um ensaio de ampliação térmica que leva em consideração a distinção entre heterocigotos e homocigotos (isto é, um ensaio de zigosidade).

[00195] Em modalidades particulares, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 ou mais moléculas de iRNA diferentes são produzidas em uma célula de planta que têm um efeito inibitório de praga de coleóptero. As moléculas de iRNA (por exemplo, moléculas de dsRNA) podem ser expressadas a partir de sequências de ácido nucleico múltiplas introduzidas em eventos de transformação diferentes, ou a partir de uma única sequência de ácido nucleico introduzida em um único evento de

transformação. Em algumas modalidades, uma pluralidade de moléculas de iRNA são expressadas sob o controle de um único promotor. Em outras modalidades, uma pluralidade de moléculas de iRNA são expressadas sob o controle de promotores múltiplos. Moléculas de iRNA únicas podem ser expressadas que compreendem sequências de ácido nucleico múltiplas que são todas homólogas a locos diferentes dentro de uma ou mais pragas de coleópteros (por exemplo, os locos definidos pela SEQ ID NO: 3 e uma ou mais das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4), ambos em populações diferentes das mesmas espécies de praga de coleóptero, ou em espécies diferentes de pragas de coleópteros.

[00196] Além da transformação direta de uma planta com uma molécula de ácido nucleico recombinante, plantas transgênicas podem ser preparadas cruzando-se uma primeira planta tendo pelo menos um evento transgênico com um segunda planta que carece de um tal evento. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico recombinante compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma molécula de iRNA pode ser introduzida em uma primeira linhagem de planta que é acessível à transformação para produzir uma planta transgênica, planta transgênica esta que pode ser cruzada com uma segunda linhagem de planta para introgressão da sequência de nucleotídeo que codifica a molécula de iRNA na base genética da segunda linhagem de planta.

[00197] Algumas modalidades da invenção também incluem produtos primários contendo uma ou mais das sequências da presente invenção que são produzidas de uma planta ou semente recombinante contendo uma ou mais das sequências de nucleotídeo da presente invenção. Um produto primário contendo uma ou mais das sequências da presente invenção é intencionado a incluir, mas não ser limitado a, farinhas, óleos, grãos ou sementes moídos ou integrais de uma planta, ou qualquer produto alimentício compreendendo qualquer farinha,

óleo, ou grão moído ou integral de uma planta ou semente recombinante contendo uma ou mais das sequências da presente invenção. A detecção de uma ou mais das sequências da presente invenção em um ou mais produtos primários considerados aqui é de fato a evidência de que o produto primário é composto de uma planta transgênica designada para expressar uma ou mais das sequências de nucleotídeos da presente invenção para o propósito de controlar a doença da planta usando métodos de supressão de gene mediada por dsRNA.

[00198] Em alguns aspectos, sementes e produtos primários produzidos por plantas transgênicas derivadas de células de plantas transformadas são incluídos, em que as sementes ou produtos primários compreendem uma quantidade detectável de uma sequência de ácido nucleico da invenção. Em algumas modalidades, tais produtos primários podem ser produzidos, por exemplo, obtendo-se plantas transgênicas e preparando-se o alimento ou alimentação a partir destas. Produtos primários compreendendo uma ou mais das sequências de ácido nucleico da invenção incluem, por exemplo e sem limitação: farinhas, óleos, grãos ou sementes moídos ou integrais de uma planta, e qualquer produto alimentício compreendendo qualquer farinha, óleo, ou grão moído ou integral de uma planta ou semente recombinante compreendendo uma ou mais das sequências de ácido nucleico da invenção. A detecção de uma ou mais das sequências da invenção em um ou mais produtos primários é de fato a evidência de que o produto primário é composto de uma planta transgênica designada para expressar uma ou mais das moléculas de iRNA da invenção para o propósito de controlar pragas de coleópteros.

[00199] Em algumas modalidades, uma planta ou semente transgênica compreendendo uma molécula de ácido nucleico da invenção também pode compreender pelo menos um outro evento transgênico em seu genoma, incluindo sem limitação: um evento transgênico do

qual é transcrita uma molécula de iRNA alvejando um loco em uma praga de coleóptero exceto aquelas definidas pelas SEQ ID NOs: 1 a 4; um evento transgênico do qual é transcrita uma molécula de iRNA alvejando um gene em um organismo exceto uma praga de coleóptero (por exemplo, um nematódeo parasítico de planta); um gene que codifica uma proteína inseticida (por exemplo, uma proteína inseticida de *Bacillus thuringiensis*); um gene de tolerância a herbicida (por exemplo, um gene que fornece tolerância ao glifosato); e um gene que contribui para um fenótipo desejável na planta transgênica, tal como rendimento aumentado, metabolismo de ácido graxo alterado, ou restauração da esterilidade masculina citoplasmática). Em modalidades particulares, sequências que codificam moléculas de iRNA da invenção podem ser combinadas com características de controle de doença e outras características de controle de inseto em uma planta para obter características desejadas para o controle realçado de doença da planta e dano por inseto. A combinação de características de controle de inseto que utilizam modos de ação distintos pode fornecer plantas transgênicas protegidas com durabilidade superior sobre plantas que abrigam uma única característica de controle, por exemplo, por causa da probabilidade reduzida que a resistência à(s) característica(s) desenvolverá no campo.

V. *Supressão de gene alvo em uma praga de coleóptero*

Visão geral

[00200] Em algumas modalidades da invenção, pelo menos uma molécula de ácido nucleico útil para o controle de pragas de coleópteros pode ser fornecida a uma praga de coleóptero, em que a molécula de ácido nucleico leva ao silenciamento de gene mediado por RNAi na praga de coleóptero. Em modalidades particulares, uma molécula de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) pode ser fornecida ao hospedeiro de coleóptero. Em algumas modalidades, uma mo-

lécula de ácido nucleico útil para o controle de pragas de coleópteros pode ser fornecida a uma praga de coleóptero contatando-se a molécula de ácido nucleico com a praga de coleóptero. Nestas e outras modalidades, uma molécula de ácido nucleico útil para o controle de pragas de coleópteros pode ser fornecida em um substrato alimentício da praga de coleóptero, por exemplo, uma composição nutricional. Nestas e outras modalidades, uma molécula de ácido nucleico útil para o controle de pragas de coleópteros pode ser fornecida através da ingestão de material da planta compreendendo a molécula de ácido nucleico que é ingerida pela praga de coleóptero. Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico está presente no material da planta através da expressão de uma sequência de ácido nucleico recombinante introduzida no material da planta, por exemplo, por transformação de uma célula de planta com um vetor compreendendo a sequência de ácido nucleico recombinante e a regeneração de um material da planta ou planta inteira da célula de planta transformada.

Supressão de gene alvo mediada por RNAi

[00201] Em modalidades, a invenção fornece moléculas de iRNA (por exemplo, dsRNA, siRNA, miRNA, e hpRNA) que podem ser designadas para alvejar sequências de nucleotídeo nativas essenciais (por exemplo, genes essenciais) no genoma e/ou uma biblioteca de cDNA de uma praga de coleóptero (por exemplo, WCR ou NCR), por exemplo, designando-se uma molécula de iRNA que compreende pelo menos um fita compreendendo uma sequência de nucleotídeo que é especificamente complementar à sequência alvo. A sequência de uma molécula de iRNA assim designada pode ser idêntica à sequência alvo, ou pode incorporar disparidades que não impedem a hibridização específica entre a molécula de iRNA e sua sequência alvo.

[00202] Moléculas de iRNA da invenção podem ser usadas em métodos para a supressão de gene em uma praga de coleóptero, deste

modo reduzindo o nível ou incidência de dano causado pela praga sobre uma planta (por exemplo, uma planta transformada protegida compreendendo uma molécula de iRNA). Como usado aqui o termo "supressão de gene" refere-se a qualquer um dos métodos bem conhecidos para reduzir os níveis de proteína produzida como um resultado da transcrição de gene ao mRNA e tradução subsequente do mRNA, incluindo a redução da expressão de proteína a partir de um gene ou uma sequência de codificação incluindo inibição pós-transcricional da expressão e supressão transcricional. A inibição pós-transcricional é mediada por homologia específica entre todo ou uma parte de um mRNA transcrito de um gene ou sequência de codificação alvejados para a supressão e pela molécula de iRNA correspondente usada para a supressão. E, inibição pós-transcricional refere-se à redução substancial e mensurável da quantidade de mRNA disponível na célula para a ligação por ribossomos.

[00203] Em modalidades em que uma molécula de iRNA é uma molécula de dsRNA, a molécula de dsRNA pode ser clivada pela enzima, DICER, em moléculas de siRNA curtas (aproximadamente 20 nucleotídeos em comprimento). A molécula de siRNA de fita dupla gerada pela atividade de DICER na molécula de dsRNA pode ser separada em dois siRNAs de fita única; a "fita de passagem" e a "fita de guia." A fita de passagem pode ser degradada, e a fita de guia pode ser incorporada em RISC. A inibição pós-transcricional ocorre por hibridização específica da fita de guia com uma sequência especificamente complementar de uma molécula de mRNA, e clivagem subsequente pela enzima, Argonaute (componente catalítico do complexo de RISC).

[00204] Em modalidades da invenção, qualquer forma de molécula de iRNA pode ser usada. Aqueles de habilidade na técnica entenderão que moléculas de dsRNA tipicamente são mais estáveis durante a preparação e durante a etapa de fornecer a molécula de iRNA a uma

célula do que de moléculas de RNA de fita única, e são tipicamente também mais estáveis em uma célula. Assim, embora moléculas de siRNA e miRNA, por exemplo, possam ser igualmente eficazes em algumas modalidades, uma molécula de dsRNA pode ser escolhida devido à sua estabilidade.

[00205] Em modalidades particulares, uma molécula de ácido nucleico é fornecida que compreende uma sequência de nucleotídeo, sequência de nucleotídeo esta que pode ser expressada *in vitro* para produzir uma molécula de iRNA que é substancialmente homóloga a uma molécula de ácido nucleico codificada por uma sequência de nucleotídeo dentro do genoma de uma praga de coleóptero. Em certas modalidades, a molécula de iRNA transcrita *in vitro* pode ser uma molécula de dsRNA estabilizada que compreende uma estrutura de haste-alça. Depois que uma praga de coleóptero contata a molécula de iRNA transcrita *in vitro*, a inibição pós-transcricional de um gene alvo na praga de coleóptero (por exemplo, um gene essencial) pode ocorrer.

[00206] Em algumas modalidades da invenção, a expressão de uma molécula de ácido nucleico compreendendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de nucleotídeo é usada em um método para a inibição pós-transcricional de um gene alvo em uma praga de coleóptero, em que a sequência de nucleotídeo é selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* (por exemplo, WCR) compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; uma sequência que não de codificação nativa de um

organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3. Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende todas ou parte de qualquer uma das SEQ ID NOs: 9 a 11 (por exemplo, toda ou parte da SEQ ID NO: 9). Em certas modalidades, a expressão de uma molécula de ácido nucleico que é pelo menos 80% idêntica (por exemplo, 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, cerca de 100%, e 100%) com qualquer um do precedente pode ser usada. Nestas e outras modalidades, uma molécula de ácido nucleico pode ser expressada que especificamente hibridiza a uma molécula de RNA presente em pelo menos uma célula de uma praga de coleóptero.

[00207] Nestas e outras modalidades, a expressão de pelo menos

uma outra molécula de ácido nucleico compreendendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de nucleotídeo pode ser usada em um método para a inibição pós-transcricional de um gene alvo em uma praga de coleóptero, em que a sequência de nucleotídeo é selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 1; o complemento da SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; o complemento da SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; o complemento da SEQ ID NO: 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4; o complemento de fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4; uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* (por exemplo, WCR) compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4; o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4; uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4; o complemento de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4; e o complemento de um fragmento de pelo menos

19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, e 4. Em certas modalidades, a expressão de uma molécula de ácido nucleico que é pelo menos 80% idêntica (por exemplo, 80%, cerca de 81%, cerca de 82%, cerca de 83%, cerca de 84%, cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, cerca de 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, cerca de 99%, cerca de 100%, e 100%) com qualquer um do precedente pode ser usada. Nestas e outras modalidades, uma molécula de ácido nucleico pode ser expressada que especificamente hibridiza a uma molécula de RNA presente em pelo menos uma célula de uma praga de coleóptero.

[00208] É uma característica importante de algumas modalidades da invenção que o sistema de inibição pós-transcricional de RNAi seja capaz de tolerar variações de sequência entre os genes alvos que poderiam ser esperadas devido à mutação genética, polimorfismo da cepa, ou divergência evolucionária. A molécula de ácido nucleico introduzida pode não precisar ser absolutamente homóloga a um produto de transcrição primário ou um mRNA completamente processado de um gene alvo, contanto que a molécula de ácido nucleico introduzida seja especificamente hibridizável a um produto de transcrição primário ou um mRNA completamente processado do gene alvo. Além disso, a molécula de ácido nucleico introduzida pode não precisar ser de tamanho natural, em relação a um produto de transcrição primário ou um mRNA completamente processado do gene alvo.

[00209] A inibição de um gene alvo usando a tecnologia de iRNA da presente invenção é específica de sequência; isto é, sequências de nucleotídeo substancialmente homólogas à(s) molécula(s) de iRNA

são alvejadas para inibição genética. Em algumas modalidades, uma molécula de RNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo idêntica a uma porção de uma sequência de gene alvo pode ser usada para inibição. Nestas e outras modalidades, uma molécula de RNA compreendendo uma sequência de nucleotídeo com uma ou mais mutações de inserção, supressão, e/ou ponto em relação a uma sequência de gene alvo podem ser usadas. Em modalidades particulares, uma molécula de iRNA e uma porção de um gene alvo podem compartilhar, por exemplo, pelo menos de cerca de 80%, pelo menos de cerca de 81%, pelo menos de cerca de 82%, pelo menos de cerca de 83%, pelo menos de cerca de 84%, pelo menos de cerca de 85%, pelo menos de cerca de 86%, pelo menos de cerca de 87%, pelo menos de cerca de 88%, pelo menos de cerca de 89%, pelo menos de cerca de 90%, pelo menos de cerca de 91%, pelo menos de cerca de 92%, pelo menos de cerca de 93%, pelo menos de cerca de 94%, pelo menos de cerca de 95%, pelo menos de cerca de 96%, pelo menos de cerca de 97%, pelo menos de cerca de 98%, pelo menos de cerca de 99%, pelo menos de cerca de 100%, e 100% de identidade de sequência. Alternativamente, a região do dúplice de uma molécula de dsRNA pode ser especificamente hibridizável com uma porção de um transcrito de gene alvo. Em moléculas especificamente hibridizáveis, uma sequência menor do que a de tamanho natural que exibe uma homologia maior compensa por uma sequência menos homóloga, mais longa. O comprimento da sequência de nucleotídeo de uma região do dúplice de uma molécula de dsRNA que é idêntica a uma porção de um transcrito de gene alvo pode ser pelo menos cerca de 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, ou pelo menos cerca de 1000 bases. Em algumas modalidades, uma sequência de mais do que 20 a 100 nucleotídeos pode ser usada. Em modalidades particulares, uma sequência de mais do que cerca de 200 a 300 nucleotídeos pode ser usada. Em modalidades

particulares, uma sequência de mais do que cerca de 500 a 1000 nucleotídeos pode ser usada, dependendo do tamanho do gene alvo.

[00210] Em certas modalidades, a expressão de um gene alvo em uma praga de coleóptero pode ser inibida em pelo menos 10%; pelo menos 33%; pelo menos 50%; ou pelo menos 80% dentro de uma célula da praga de coleóptero, tal que uma inibição significativa ocorre. Inibição significativa refere-se à inibição acima de um limiar que resulta em um fenótipo detectável (por exemplo, cessação do crescimento, cessação da alimentação, cessação do desenvolvimento, e mortalidade do inseto, etc.), ou uma diminuição detectável no RNA e/ou produto genético correspondendo ao gene alvo que é inibido. Embora em certas modalidades da invenção a inibição ocorra em substancialmente todas as células da praga de coleóptero, em outras modalidades a inibição ocorre apenas em um subconjunto de células que expressam o gene alvo.

[00211] Em algumas modalidades, a supressão transcricional é mediada pela presença em uma célula de uma molécula de dsRNA que exibe identidade de sequência substancial a uma sequência promotora de DNA ou ao complemento desta para efetuar o que é referido como "trans supressão de promotor." A supressão de gene pode ser eficaz contra genes alvos em uma praga de coleóptero que pode ingerir ou contatar tais moléculas de dsRNA, por exemplo, ingerindo-se ou contatando-se o material da planta contendo as moléculas de dsRNA. Moléculas de dsRNA para uso em trans supressão de promotor podem ser especificamente designadas para inibir ou suprimir a expressão de uma ou mais sequências homólogas ou complementares nas células da praga de coleóptero. A supressão de gene pós-transcricional por RNA orientado antissenso ou senso para regular a expressão do gene em células de plantas é divulgada nas Patentes U.S. 5.107.065; 5.759.829; 5.283.184; e 5.231.020.

[00212] **Expressão de moléculas de iRNA fornecidas a uma praga de coleóptero**

[00213] A expressão de moléculas de iRNA para a inibição de gene mediada por RNAi em uma praga de coleóptero pode ser realizada em qualquer um de muitos formatos *in vitro* ou *in vivo*. As moléculas de iRNA depois podem ser fornecidas a uma praga de coleóptero, por exemplo, contatando-se as moléculas de iRNA com a praga, ou fazendo-se com que a praga ingira ou de outro modo internalize as moléculas de iRNA. Algumas modalidades da invenção incluem plantas hospedeiras transformadas de uma praga de coleóptero, células de plantas transformadas, e progênie de plantas transformadas. As células de plantas transformadas e plantas transformadas podem ser engendradas para expressar uma ou mais das moléculas de iRNA, por exemplo, sob o controle de um promotor heterólogo, para fornecer um efeito protetivo contra a praga. Assim, quando uma planta transgênica ou célula de planta é consumida por uma praga de coleóptero durante a alimentação, a praga pode ingerir moléculas de iRNA expressadas nas plantas ou células transgênicas. As sequências de nucleotídeo da presente invenção também podem ser introduzidas em uma variedade ampla de micro-organismos hospedeiros procarióticos e eucarióticos para produzir moléculas de iRNA. O termo "micro-organismo" inclui espécies procarióticas e eucarióticas, tais como bactérias e fungos.

[00214] A modulação da expressão do gene pode incluir supressão parcial ou completa de tal expressão. Em uma outra modalidade, um método para a supressão da expressão do gene em uma praga de coleóptero compreende fornecer no tecido do hospedeiro da praga uma quantidade supressiva de gene de pelo menos uma molécula de dsRNA transcrita de uma sequência de nucleotídeo como descrito aqui, pelo menos um segmento da qual é complementar a uma sequência de mRNA dentro das células da praga de coleóptero. Uma molécula

de dsRNA, incluindo sua forma modificada tal como uma molécula de siRNA, miRNA, ou hpRNA, ingerida por um micro-organismo patogênico de acordo com a invenção pode ser pelo menos de cerca de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou cerca de 100% idêntica a uma molécula de RNA transcrita de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 1 a 4. Moléculas de ácido nucleico isoladas e substancialmente purificadas incluindo, mas não limitadas a, sequências de nucleotídeo que não ocorrem naturalmente e construções de DNA recombinante para transcreever moléculas de dsRNA da presente invenção são portanto fornecidas, que suprimem ou inibem a expressão de uma sequência de codificação endógena ou uma sequência de codificação alvo na praga de coleóptero quando introduzida a esta.

[00215] Modalidades particulares fornecem um sistema de liberação para a liberação de moléculas de iRNA para a inibição pós-transcrição de um ou mais genes alvos em uma praga de coleóptero parasítica de planta e controle de uma população da praga de coleóptero parasítica de planta. Em algumas modalidades, o sistema de liberação compreende a ingestão de uma célula de planta transgênica hospedeira ou conteúdos da célula hospedeira compreendendo moléculas de RNA transcritas na célula hospedeira. Nestas e outras modalidades, uma célula de planta transgênica ou uma planta transgênica é gerada que contém uma construção de DNA recombinante transcrevendo uma molécula de dsRNA estabilizada da invenção. Células de plantas transgênicas e plantas transgênicas compreendendo sequências de ácido nucleico que codificam uma molécula de iRNA particular podem ser produzidas utilizando-se tecnologias de DNA recombinante (tecnologias básicas estas que são bem conhecidas na técnica) para cons-

truir um vetor de transformação de planta compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica uma molécula de iRNA da invenção (por exemplo, uma molécula de dsRNA estabilizada); para transformar uma célula de planta ou planta; e para gerar a célula de planta transgênica ou a planta transgênica que contém a molécula de iRNA transcrita.

[00216] Para comunicar resistência à praga de coleóptero a uma planta transgênica, uma molécula de DNA recombinante pode, por exemplo, ser transcrita em uma molécula de iRNA, tal como uma molécula de dsRNA, uma molécula de siRNA, uma molécula de miRNA, ou uma molécula de hpRNA. Em algumas modalidades, uma molécula de RNA transcrita de uma molécula de DNA recombinante pode formar uma molécula de dsRNA dentro dos tecidos ou fluidos da planta recombinante. Uma tal molécula de dsRNA pode ser compreendida em parte de uma sequência de nucleotídeo que é idêntica a uma sequência de nucleotídeo correspondente transcrita de uma sequência de DNA dentro de uma praga de coleóptero de um tipo que pode parasitar a planta hospedeira. A expressão de um gene alvo dentro da praga de coleóptero é suprimida pela molécula de dsRNA, e a supressão da expressão do gene alvo na praga de coleóptero resulta na planta transgênica sendo resistente à praga de coleóptero. Os efeitos moduladores de moléculas de dsRNA mostraram ser aplicáveis a uma variedade de genes expressados em pragas, incluindo, por exemplo, genes endógenos responsáveis pelo metabolismo celular ou transformação celular, incluindo genes reguladores; fatores de transcrição; genes relacionados à muda; e outros genes que codificam polipeptídeos envolvidos no metabolismo celular ou crescimento e desenvolvimento normais.

[00217] Para a transcrição de um transgene *in vivo* ou uma construção de expressão, uma região reguladora (por exemplo, promotor, re-

alçador, silenciador, e sinal de poliadenilação) pode ser usada em algumas modalidades para transcrever a fita de RNA (ou fitas). Portanto, em algumas modalidades, como apresentado, *supra*, uma sequência de nucleotídeo para uso em produzir moléculas de iRNA pode ser operavelmente ligada a uma ou mais sequência promotoras funcionais em uma célula hospedeira da planta. O promotor pode ser um promotor endógeno, normalmente residente no genoma do hospedeiro. A sequência de nucleotídeo da presente invenção, sob o controle de um sequência promotora operavelmente ligada, pode ser ainda flanqueada por sequências adicionais que vantajosamente afetam sua transcrição e/ou a estabilidade de um transcrito resultante. Tais sequências podem ser localizadas a montante do promotor operavelmente ligado, a jusante da extremidade 3' da construção de expressão, e podem ocorrer tanto a montante do promotor quanto a jusante da extremidade 3' da construção de expressão.

[00218] Algumas modalidades fornecem métodos para reduzir o dano a uma planta hospedeira (por exemplo, uma planta do milho) causado por uma praga de coleóptero que alimenta-se da planta, em que o método compreende fornecer na planta hospedeira uma célula de planta transformada expressando pelo menos uma molécula de ácido nucleico da invenção, em que a(s) molécula(s) de ácido nucleico funciona(m) em ser absorvida(s) pela praga de coleóptero para inibir a expressão de uma sequência alvo dentro da praga de coleóptero, inibição esta de expressão que resulta em mortalidade, crescimento reduzido, e/ou reprodução reduzida da praga de coleóptero, reduzindo deste modo o dano à planta hospedeira causado pela praga de coleóptero. Em algumas modalidades, a(s) molécula(s) de ácido nucleico compreendem moléculas de dsRNA. Nestas e outras modalidades, a(s) molécula(s) de ácido nucleico compreendem moléculas de dsRNA que todas compreendem mais do que uma sequência de nucleotídeo

que é especificamente hibridizável a uma molécula de ácido nucleico expressada em uma célula de praga de coleóptero. Em algumas modalidades, a(s) molécula(s) de ácido nucleico consistem em uma sequência de nucleotídeo que é especificamente hibridizável a uma molécula de ácido nucleico expressada em uma célula de praga de coleóptero.

[00219] Em algumas modalidades, um método para aumentar o rendimento de uma safra de milho é fornecido, em que o método compreende introduzir em uma planta do milho pelo menos uma molécula de ácido nucleico da invenção; cultivar a planta do milho para permitir a expressão de uma molécula de iRNA compreendendo a sequência de ácido nucleico, em que a expressão de uma molécula de iRNA compreendendo a sequência de ácido nucleico inibe o dano e/ou crescimento da praga de coleóptero, reduzindo ou eliminando deste modo uma perda de rendimento devido à infestação por praga de coleóptero. Em algumas modalidades, a molécula de iRNA é uma molécula de dsRNA. Nestas e outras modalidades, a(s) molécula(s) de ácido nucleico compreendem moléculas de dsRNA que todas compreendem mais do que uma sequência de nucleotídeo que é especificamente hibridizável a uma molécula de ácido nucleico expressada em uma célula de praga de coleóptero. Em algumas modalidades, a(s) molécula(s) de ácido nucleico consistem em uma sequência de nucleotídeo que é especificamente hibridizável a uma molécula de ácido nucleico expressada em uma célula de praga de coleóptero.

[00220] Em algumas modalidades, um método para modular a expressão de um gene alvo em uma praga de coleóptero é fornecido, o método compreendendo: transformar uma célula de planta com um vetor compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos uma molécula de ácido nucleico da invenção, em que a sequência de nucleotídeo é operativamente ligada a um promotor e

uma sequência de terminação de transcrição; cultivar a célula de planta transformada sob condições suficientes para levar em consideração o desenvolvimento de uma cultura de célula de planta incluindo uma pluralidade de células de plantas transformadas; selecionar células de plantas transformadas que têm integrada a molécula de ácido nucleico em seus genomas; triar as células de plantas transformadas quanto à expressão de uma molécula de iRNA codificada pela molécula de ácido nucleico integrada; selecionar uma célula de planta transgênica que expressa a molécula de iRNA; e alimentar a célula de planta transgênica selecionada à praga de coleóptero. Plantas também podem ser regeneradas a partir de células de plantas transformadas que expressam uma molécula de iRNA codificada pela molécula de ácido nucleico integrada. Em algumas modalidades, a molécula de iRNA é uma molécula de dsRNA. Nestas e outras modalidades, a(s) molécula(s) de ácido nucleico compreendem moléculas de dsRNA que todas compreendem mais do que uma sequência de nucleotídeo que é especificamente hibridizável a uma molécula de ácido nucleico expressada em uma célula de praga de coleóptero. Em algumas modalidades, a(s) molécula(s) de ácido nucleico consistem em uma sequência de nucleotídeo que é especificamente hibridizável a uma molécula de ácido nucleico expressada em uma célula de praga de coleóptero.

[00221] Moléculas de iRNA da invenção podem ser incorporadas dentro de ou sobre as sementes de uma espécie de planta (por exemplo, milho), como um produto da expressão de um gene recombinante incorporado em um genoma das células de plantas, ou como incorporado em um revestimento ou tratamento da semente que é aplicado à semente antes do plantio. Uma célula de planta compreendendo um gene recombinante é considerada ser um evento transgênico. Também incluídos são sistemas de liberação para a liberação de moléculas de iRNA a pragas de coleópteros. Por exemplo, as moléculas de

iRNA da invenção podem ser diretamente introduzidas nas células de uma praga de coleóptero. Métodos para introdução podem incluir mistura direta de iRNA com tecido da planta de um hospedeiro para a praga de coleóptero, assim como aplicação de composições compreendendo moléculas de iRNA da invenção ao tecido da planta hospedeira. Por exemplo, moléculas de iRNA podem ser pulverizadas sobre uma superfície da planta. Alternativamente, uma molécula de iRNA pode ser expressada por um micro-organismo, e o micro-organismo pode ser aplicado sobre a superfície da planta, ou introduzido em uma raiz ou haste por um meio físico tal como uma injeção. Como debatido, *supra*, uma planta transgênica também pode ser geneticamente engendrada para expressar pelo menos uma molécula de iRNA em uma quantidade suficiente para manter as pragas de coleópteros conhecidas infestar a planta. Moléculas de iRNA produzidas por síntese química ou enzimática também podem ser formuladas em uma maneira compatível com práticas agrícolas comuns, e usado como produtos de pulverização para controlar a doença da planta. As formulações podem incluir os adesivos e umedecedores apropriados necessários para cobertura foliar eficiente, assim como protetores UV para proteger moléculas de iRNA (por exemplo, moléculas de dsRNA) do dano UV. Tais aditivos são comumente usados na indústria de bioinseticida, e são bem conhecidos àqueles habilitados na técnica. Tais aplicações podem ser combinadas com outras aplicações de inseticida por pulverização (de base biológica ou de outro modo) para realçar a proteção da planta de pragas de coleópteros.

[00222] Todas as referências, incluindo publicações, patentes, e pedidos de patente, citados aqui são por meio desta incorporados por referência à medida que eles não são incompatíveis com os detalhes explícitos desta divulgação, e são deste modo incorporados ao mesmo grau como se cada referência fosse individual e especificamente indi-

cada para ser incorporada por referência e foram apresentados em sua totalidade aqui. As referências debatidas aqui são fornecidas unicamente para sua divulgação antes da data de depósito do presente pedido. Nada aqui deve ser interpretado como uma admissão de que os inventores não são intitulados a antedatar tal divulgação em virtude da invenção anterior.

[00223] Os Exemplos seguintes são fornecidos para ilustrar certas características e/ou aspectos particulares. Estes Exemplos não devem ser interpretados para limitar a divulgação às características ou aspectos particulares descritos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Materiais e Métodos

Preparação da amostra e bioensaios.

[00224] Várias moléculas de dsRNA (incluindo Caf1-180; região 1 da subunidade C de ATPase vacuolar (v-ATPase); região 2 de subunidade C de v-ATPase; região 1 de subunidade H de v-ATPase; região 2 de subunidade H de v-ATPase; e Rho1) foram sintetizadas e purificadas usando um kit de RNAi MEGAscript® (AMBION, Foster City, CA). As moléculas de dsRNA purificadas foram preparadas em tampão de TE, e todos os bioensaios continham um tratamento de controle consistindo neste tampão, que serviu como uma verificação de base quanto à mortalidade ou inibição do crescimento de WCR. As concentrações de moléculas de dsRNA no tampão de bioensaio foram medidas usando um espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

[00225] Amostras foram testadas quanto à atividade do inseto em bioensaios conduzidos com larvas de insetos neonatas em dieta para inseto artificial. Ovos de WCR foram obtidos da Crop Characteristics, Inc. (Farmington, MN).

[00226] Os bioensaios foram conduzidos em bandejas plásticas de

128 reservatórios especificamente designadas para bioensaios de insetos (C-D International, Pitman, NJ). Cada reservatório continha aproximadamente 1,0 mL de uma dieta designada para o crescimento de insetos coleópteros. Uma alíquota de 60 µL de amostra de proteína foi liberada por pipeta sobre a superfície da dieta de 1,5 cm² de cada reservatório (40 µL/cm²). Concentrações de amostra de dsRNA foram calculadas como a quantidade de dsRNA por centímetro quadrado (ng/cm²) de área superficial no reservatório. As bandejas tratadas foram mantidas em uma capela até que o líquido na superfície da dieta evaporasse ou fosse absorvido na dieta.

[00227] Dentro de algumas horas de eclosão, larvas individuais foram extraídas com uma escova de pelo de carneiro umedecida e depositadas na dieta tratada (uma ou duas larvas por reservatório). Os reservatórios infestados das bandejas plásticas de 128 reservatórios foram depois selados com lâminas adesivas de plástico claro, e ventilados para permitir troca de gás. Bandejas de bioensaio foram mantidas sob condições ambientais controladas (28° C, ~40 % de Umidade Relativa, 16:8 [Luz:Escuridão]) durante 9 dias, depois do que o número total de insetos expostos a cada amostra, o número de insetos mortos, e o peso de insetos sobreviventes foram registrados. Mortalidade percentual, pesos vivos médios, e inibição do crescimento foram calculados para cada tratamento. O retardo do desenvolvimento foi definido como uma diminuição em pesos vivos médios. A inibição do crescimento (GI) foi calculada como segue:

$$GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)]$$

[00228] onde TWIT é o peso total de insetos vivos no tratamento;

[00229] TNIT é o número total de insetos no tratamento;

[00230] TWIBC é o peso total de insetos vivos na verificação de base (Controle por tampão); e

[00231] TNIBC é o número total de insetos na verificação de base

(Controle por tampão).

[00232] A GI_{50} é determinada para ser a concentração da amostra na dieta em que o valor de GI é 50 %. A LC_{50} (concentração letal a 50 %) é registrada como a concentração da amostra na dieta em que 50 % de insetos de teste são mortos. Análise estatística foi feita usando o software JMP™ (SAS, Cary, NC).

[00233] Bioensaios replicados demonstraram que a ingestão de amostras resulta em uma mortalidade e inibição do crescimento surpreendentes e inesperadas de larvas de crisomelídeo do milho.

Exemplo 2: Identificação de genes alvos candidatos

[00234] Larvas de WCR de primeiro instar foram selecionadas para análise de transcriptoma porque o controle neste estágio de crescimento por tecnologia de resistência a inseto transgênico seria vantajoso.

[00235] O RNA total foi isolado de cerca de 0,9 gm de larvas de WCR de primeiro instar inteiras (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte; 4 a 5 dias após a saída do ovo, mantida a 16°C) e purificado usando o método com base em fenol/TRI REAGENT® seguinte (Molecular Research Center, Cincinnati, OH; Cat. Nº TR 118):

[00236] Larvas foram homogeneizadas na temperatura ambiente em um homogeneizador de 15 mL com 10 mL de TRI REAGENT® até que uma suspensão homogênea fosse obtida. A seguir da incubação de 5 min. na temperatura ambiente, o homogenado foi dispensado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (1 mL por tubo), 200 µL de clorofórmio foram adicionados, e a mistura foi vigorosamente agitada durante 15 segundos. Depois de deixar a extração repousar na temperatura ambiente durante 10 min, as fases foram separadas por centrifugação em 12.000 x g a 4°C. A fase superior (compreendendo cerca de 0,6 mL) foi cuidadosamente transferida em um outro tubo de 1,5 mL estéril, e um volume igual (0,6 mL) de isopropanol na temperatura am-

biente foi adicionado. Depois da incubação na temperatura ambiente durante 5 a 10 min, a mistura foi centrifugada 8 min em 12.000 x g (4°C ou 25°C).

[00237] O sobrenadante foi cuidadosamente removido e descartado, e a pelota de RNA foi lavada duas vezes por vórtice com 75% de etanol, com recuperação por centrifugação durante 5 min em 7.500 x g (4°C ou 25°C) depois de cada lavagem. O etanol foi cuidadosamente removido, a pelota foi deixada secar ao ar durante 3 a 5 min, e depois foi dissolvida em água estéril isenta de nuclease. A concentração do RNA foi determinada medindo-se a absorvência (A) em 260 nm e 280 nm. Uma extração típica de cerca de 0,9 g de larvas produziu mais de 1 mg de RNA total, com uma razão de A260/ A280 de 1,9. O RNA assim extraído foi armazenado a -80°C até que processado ainda mais.

[00238] A qualidade do RNA foi determinada passando-se uma alíquota por um gel de agarose a 1 %. A solução de gel de agarose foi fabricada usando 10 X tampão de TAE esterilizado em autoclave (Tris-acetato EDTA, 1 X concentração é 0,04 M de Tris-acetato, 1 mM de EDTA (sal de sódio de ácido etilenodiamina tetra-acético, pH 8,0) diluído com água tratada com DEPC (pirocarbonato de dietila) em um recipiente esterilizado em autoclave. 1 X TAE foi usado como o tampão contínuo. Antes do uso, o tanque de eletroforese e o pente de formação favorável foram limpos com RNaseAway™ (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). Dois µL de amostra de RNA foram misturados com 8 µL de tampão de TE (10 mM de Tris HCl pH 7,0; 1 mM de EDTA) e 10 µL de tampão de amostra de RNA (Novagen® Catalog N° 70606; EMD4 Bioscience, Gibbstown, NJ). A amostra foi aquecida a 70°C durante 3 min, resfriada até a temperatura ambiente, e 5 µL foram carregados por reservatório (contendo 1 µg a 2 µg de RNA). Marcadores de peso molecular de RNA comercialmente disponíveis foram simultaneamente conduzidos em reservatórios separados para comparação do tamanho

molecular. O gel foi conduzido em 60 v durante 2 h.

[00239] Um biblioteca de cDNA normalizada foi preparada a partir do RNA total larval por um provedor de acesso comercial (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL), usando iniciação aleatória.

[00240] A biblioteca de cDNA larval normalizada foi sequenciada em escala de placa 1/2 por GS FLX 454 Titanium™ series chemistry at Eurofins MWG Operon, que resultou em mais de 600.000 leituras com um comprimento de leitura médio de 348 pb. 350.000 leituras foram montadas em mais de 50.000 contigs. Tanto as leituras não montadas quanto os contigs foram convertidos em bases de dados BLASTable usando o programa publicamente disponível, FORMATDB (disponível da National Center for Biological Information (NCBI)).

[00241] Genes candidatos para alvejamento de RNAi foram selecionados usando informação com respeito aos efeitos letais de RNAi de genes particulares em outros insetos tais como *Drosophila* e *Tribolium*. Estes genes foram hipotetizados para ser essenciais para sobrevivência e crescimento em insetos coleópteros. Homólogos de gene alvo selecionados foram identificados na base de dados de sequência de transcriptoma como descrito abaixo. Sequências de tamanho natural ou parciais dos genes alvos foram ampliadas por PCR para preparar padrões para a produção de RNA de fita dupla (dsRNA).

[00242] Pesquisas de TBLASTN usando sequências de codificação de proteína candidatas foram conduzidas contra bases de dados BLASTable contendo as leituras de sequência de *Diabrotica* não montadas ou os contigs montados. Hits significantes a uma sequência de *Diabrotica* (definida como melhor do que e^{-20} para homologias de contigs e melhor do que e^{-10} para homologias de leituras de sequências não montadas) foram confirmados usando BLASTX contra a base de dados não redundante de NCBI. Os resultados desta pesquisa de BLASTX confirmaram que as sequências de gene candidato homólogo-

gas de *Diabrotica* identificadas na pesquisa de TBLASTN de fato compreenderam genes de *Diabrotica*, ou foram o melhor hit disponível nas sequências de *Diabrotica* para a sequência de gene candidato que não de *Diabrotica*. Na maioria dos casos, genes candidatos de *Tribolium* que foram anotados como codificando uma proteína forneceram uma homologia de sequência não ambígua a uma sequência ou sequências nas sequências de transcriptoma de *Diabrotica*. Em alguns casos, esteve claro que alguns dos contigs de *Diabrotica* ou leituras de sequência não montadas selecionados por homologia a um gene candidato que não de *Diabrotica* sobreposto, e que a montagem dos contigs falhou para unir estas superposições. Nestes casos, Sequencher™ v4.9 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) foi usado para montar as sequências em contigs mais longos.

[00243] Uma pluralidade de genes alvos candidatos foi identificada como genes que podem levar à mortalidade ou inibição do crescimento, desenvolvimento, ou reprodução da praga de coleóptero em WCR, incluindo as SEQ ID NOs: 1 a 4. Clones de tamanho natural ou parciais de sequências de homólogos de gene candidato de *Diabrotica* foram usados para gerar amplicons de PCR para a síntese de dsRNA.

[00244] A SEQ ID NO: 1 corresponde a D_vir_c47185, que é um homólogo de Caf1-180, e é aqui referido como Caf1-180. Caf1-180 de *Drosophila* mostrou funcionar em liberar histonas sobre o DNA recentemente sintetizado, e Caf1-180. Mutações com perda de função em Caf1-180 *Drosophila* mostraram causar parada do crescimento e desenvolvimento larvais, e mortalidade larval (Klapholz *et al.* (2009) Chromosoma 118(2):235-48; Tyler *et al.* (2001) Mol. Cell Biol. 21(19):6574-84; Song *et al.* (2007) Dev. Biol. 311(1):213-22).

[00245] A SEQ ID NO: 2 corresponde a D_vir_c1229, que é um homólogo da subunidade C de ATPase vacuolar, e é aqui referido como VatpaseC. As SEQ ID NOs: 5 a 8 são fragmentos de sequência

não contíguos de VAtpaseC.

[00246] A SEQ ID NO: 3 corresponde a D_vir_c1319, que é um homólogo da subunidade H de ATPase vacuolar, e é aqui referido como VAtpaseH. As SEQ ID NOs: 9 a 11 são fragmentos de sequência não contíguos de VAtpaseH.

[00247] ATPase vacuolar de *Drosophila* é um transportador de próton de subunidade múltipla envolvido na sinalização Notch (Vaccari *et al.* (2010) *Development* 137(11):1825-32). Mutações com perda de função em subunidades de ATPase vacuolar de *Drosophila* mostraram ser letais recessivas (Allan *et al.* (2005) *Physiol. Genomics* 22(2):128-38; e Davies *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271(48):30677-84). VAtpaseC (Vha44) e VATPaseH (VhaSFD) são duas das subunidades de ATPase vacuolar de *Drosophila*.

[00248] A SEQ ID NO: 4 é Contig_01_Rho1_1-191_CDC42, aqui referido como Rho1. Rho1 de *Drosophila* funciona em regular a montagem e desmontagem de fitas de actina, e mutações com perda de função em Rho1 *Drosophila* têm um impacto significativo sobre o movimento do componente celular, remodelagem da sinapse, desenvolvimento larval, e resposta ao estresse (Fox *et al.* (2005) *Development* 132(21):4819-31; Kadandale *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(23):10502-7; Rosales-Nieves *et al.* (2006) *Nat. Cell Biol.* 8(4):367-76; Magie e Parkhurst (2005) *Dev. Biol.* 278(1):144-54; e Xu *et al.* (2008) *Dev. Biol.* 321(1):88-100).

Exemplo 3: Ampliação de genes alvos

[00249] Iniciadores foram designados para ampliar porções de regiões de codificação de cada gene alvo por PCR. Ver a Tabela 1. Onde apropriado, uma sequência promotora de fago T7 (TTAATACGACTCACTATAGGGAGA (SEQ ID NO: 12)) foi incorporada na extremidade 5' das fitas senso ou antissenso ampliadas. Ver a Tabela 1. O DNA genômico foi extraído de WCR, e os iniciadores de PCR foram usados

para ampliar toda ou parte da sequência de gene alvo nativa a partir do DNA genômico por intermédio de uma reação de PCR.

Tabela 1. Sequências e pareamentos de iniciadores de PCR usados para preparar padrões para a produção de dsRNA.

	Gene (Região)	ID do Iniciador	SEQ ID NO:	Sequência
Par 1	Caf1-180 (1)	Caf-FT7	SEQ ID NO: 13	TTAATACGACTCACTATAG GGAGATTTCGGAAGCTTCA TATTTAAAAGATC
	Caf1-180 (1)	Caf-R	SEQ ID NO: 14	TATCTTCAGCCAAAGGTTT TCTTG
Par 2	Caf1-180 (1)	Caf-F	SEQ ID NO: 15	TTCGGAAGCTTCATATTTA AAAGATC
	Caf1-180 (1)	Caf-RT7	SEQ ID NO: 16	TTAATACGACTCACTATAG GGAGATATCTTCAGCCAA AGGTTTTCTTG
Par 3	VatpaseC (1)	Atp.C-F1T7	SEQ ID NO: 17	TTAATACGACTCACTATAG GGAGAAGAAGAAATGACT GAGTATTGG
	VatpaseC (1)	Atp.C-R1	SEQ ID NO: 18	CTGAAGACTTCCTTTCAA GT
Par 4	VatpaseC (1)	Atp.C-F1	SEQ ID NO: 19	AGAAGAAATGACTGAGTA TTGG
	VatpaseC (1)	Atp.C-R1T7	SEQ ID NO: 20	TTAATACGACTCACTATAG GGAGACTGAAGACTTCCT TTCAAGT
Par 5	VatpaseC (1)	Atp.C-F1	SEQ ID NO: 19	AGAAGAAATGACTGAGTA TTGG
	VatpaseC (1)	Atp.C- R1shortT7	SEQ ID NO: 21	TTAATACGACTCACTATAG GGAGAGATGGGATATTTG GCGATGTCCCA
Par 6	VatpaseC (1)	Atp.C-F1T7	SEQ ID NO: 17	TTAATACGACTCACTATAG GGAGAAGAAGAAATGACT GAGTATTGG
	VatpaseC (1)	Atp.C- R1short	SEQ ID NO: 22	GATGGGATATTTGGCGAT GTCCCA
Par 7	VatpaseC (2)	Atp.C-F2T7	SEQ ID NO: 23	TTAATACGACTCACTATAG GGAGAAGAAACAGACAGG AAGTTTACT
	VatpaseC (2)	Atp.C-R2	SEQ ID NO: 24	GGATTAAAATAGCTTGGA AATTGAC

Par 8	VatpaseC (2)	Atp.C-F2	SEQ ID NO: 25	AGAAACAGACAGGAAGTT TACT
	VatpaseC (2)	Atp.C-R2T7	SEQ ID NO: 26	TTAATACGACTCACTATA- GGGAGAGGATTAATAATAG- CTTGGAATTGAC
Par 9	VatpaseH (1)	Atp.H-F1T7	SEQ ID NO: 27	TTAATACGACTCACTATAG GGAGA TCATGATTGTTCC AGATATGTTGG
	VatpaseH (1)	Atp.H-R1	SEQ ID NO: 28	AGTGTCTGCGACCAACAA GC
Par 10	VatpaseH (1)	Atp.H-F1	SEQ ID NO: 29	TCATGATTGTTCCAGATAT GTTGG
	VatpaseH (1)	Atp.H-R1T7	SEQ ID NO: 30	TTAATACGACTCACTATAG GGAGAAGTGTCTGCGAC CAACAAGC
Par 11	VatpaseH (2)	Atp.H-F2T7	SEQ ID NO: 31	TTAATACGACTCACTATAG GGAGAAGAACATTGTATAG CTATGGTG
	VatpaseH (2)	Atp.H-R2	SEQ ID NO: 32	ATTTACGCCTTGCCTGCG AC
Par 12	VatpaseH (2)	Atp.H-F2	SEQ ID NO: 33	AGAACATTGTATAGCTATG GTG
	VatpaseH (2)	Atp.H-R2T7	SEQ ID NO: 34	TTAATACGACTCACTATAG GGAGAATTTACGCCTTGC CTGCGAC
Par 13	Rho1 (1)	Rho1-FT7	SEQ ID NO: 35	TTAATACGACTCACTATAG GGAGACAGGTCCGATGG CTGCAATAAG
	Rho1 (1)	Rho1-R	SEQ ID NO: 36	GACTTGCAGTGCAGCTCG GG
Par 14	Rho1 (1)	Rho1-F	SEQ ID NO: 37	CAGGTCCGATGGCTGCAA TAAG
	Rho1 (1)	Rho1-RT7	SEQ ID NO: 38	TTAATACGACTCACTATAG GGAGAGACTTGCAGTGCA GCTCGGG

Exemplo 4: Construções de RNAi

Preparação padrão por PCR e síntese de dsRNA.

[00250] A estratégia usada para fornecer padrões específicos para a produção de dsRNA *in vitro* é mostrada na figura 1. DNAs padrão intencionados para o uso na síntese de dsRNA foram preparados por PCR usando os pares de iniciador na Tabela 1 e (como padrão de

PCR) cDNA de primeira fita preparado a partir do RNA total isolado de larvas de primeiro instar de WCR. Para cada região de gene alvo selecionada, duas ampliações por PCR separadas foram realizadas. A primeira ampliação por PCR introduziu uma sequência promotora de T7 na extremidade 5' das fitas senso ampliadas. A segunda reação incorporou a sequência promotora de T7 nas extremidades 5' das fitas antissenso. Os dois fragmentos ampliados por PCR para cada região dos genes alvos foram depois misturados em quantidades aproximadamente iguais, e a mistura foi usada como padrão de transcrição para a produção de dsRNA. RNA de fita dupla da figura 1. foi sintetizado e purificado usando um kit de RNAi Ambion® MEGAscript® seguindo as instruções do fabricante (Foster City, CA). As sequências dos padrões de dsRNA ampliados com os iniciadores particulares foram: SEQ ID NO: 86 (Caf1-180); SEQ ID NOs: 7 e 8 (VatpaseC); SEQ ID NOs: 10 e 11 (VatpaseH); e SEQ ID NO: 87 (Rho1). As concentrações de dsRNAs foram medidas usando um espectrofotômetro NanoDrop™ 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Construção de vetores de transformação de planta - Método 1

[00251] Métodos de clonagem de sítio múltiplo padrão Gateway® (Invitrogen) foram usados para construir vetores de expressão de RNA do tipo grampo de cabelo (hpRNA) para transformação celular do milho mediada por WHISKERS™. Vetores de entrada separados foram construídos para os dois genes marcadores utilizados para triagem/seleção de células do milho depois da transformação; um gene de proteína fluorescente amarela (YFP, Shagin *et al.* (2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50) e um gene de tolerância a herbicida (fosfotricina acetil transferase (PAT), Wehrmann *et al.* (1996) Nat. Biotechnol. 14(10):1274-8). A expressão de cada um destes foi controlada por uma cópia de um promotor de actina 1 do arroz (OsAct1, Patente U.S. 5.641.876). Um fragmento compreendendo uma região 3' não traduzi-

da de um gene de peroxidase 5 do milho (ZmPer5 3' UTR v2, Patente U.S. 6.699.984) foi usado para terminar a transcrição dos genes.

[00252] Um terceiro tipo de vetor de entrada, designado para a produção de hpRNA, também foi construído utilizando fragmentos do gene de Caf1-180 ou do gene de VatpaseC. Regiões de gene alvo para Caf1-180 e VatpaseC foram ampliadas para a síntese de grampo de cabelo usando os iniciadores apresentados na Tabela 2. A formação de grampo de cabelo intramolecular por Transcritos primários de RNA foi facilitada arranjando-se (dentro de uma única unidade de transcrição) duas cópias do fragmento de gene alvo em orientação oposta uma à outra, os dois fragmentos sendo separados por uma sequência de íntron de ST-LS1 (Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50). A produção do transcrito de mRNA primário foi conduzida por uma cópia do promotor de ubiquitina 1 do milho (Patente U.S. 5.510.474). Assim, o transcrito de mRNA primário contém as duas sequências de fragmento de gene como repetições invertidas grandes entre si, separadas pela sequência de íntron. Um fragmento compreendendo uma região não traduzida 3' de um gene de lipase do milho (ZmLip 3' UTR, Patente U.S. 7.179.902) foi usado para terminar a transcrição dos genes.

Tabela 2. Sequências e pareamentos de iniciadores usados para preparar construções de grampo de cabelo para a transformação do milho.

	Gene	ID do Iniciador	SEQ ID NO:	Sequência
Par 15	Caf1-180	hpCaf-F	SEQ ID NO: 39	GAGAGGTACCTCGGAAGCTT CATATTTAAAAGATCTGTC
	Caf1-180	hpCaf-R	SEQ ID NO: 40	CTCTGGATCCAAAATGTTTTT TATCTTCAGCCAAAGGTTTTTC
Par 16	Caf1-180	hp-invCaf-F	SEQ ID NO: 41	AGAGCCATGGAAAATGTTTTT TATCTTCAGCCAAAGGTTTTTC

	Caf1-180	hp-invCaf-R	SEQ ID NO: 42	CTCTGAGCTCTCGGAAGCTT CATATTTAAAAGATCTGTC
Par 17	ST-SL1	ST-LS1-F	SEQ ID NO: 43	AGAGGGATCCAGGCCTAGG TATGTTTCTGCTTCTACCTTT GAT
	ST-SL1	ST-LS1-R	SEQ ID NO: 44	CTCTCCATGGACCGGTATTTAA ATACCTGCACATCACCATGTTT TGG
Par 18	VatpaseC	hpATPaseC-F	SEQ ID NO: 45	AGAGGGTACCAGAAGAAATG ACTGAGTATTGGTTGATATC
	VatpaseC	hpATPaseC-R	SEQ ID NO: 46	CTCTGGATCCGATGGGATATT TGGCGATGTCC
Par 19	VatpaseC	hp-invATPaseC-F	SEQ ID NO: 47	AGAGCCATGGGATGGGATATT TGGCGATGTCC
	VatpaseC	hp-invATPaseC-R	SEQ ID NO: 48	GCTGAGCTCAGAAGAAATGA CTGAGTATTGGTTGATATC

[00253] A SEQ ID NO: 49 apresenta uma sequência de formação em grampo de cabelo de Caf1-180, e a SEQ ID NO: 50 apresenta uma sequência de formação em grampo de cabelo de VatpaseC.

[00254] Duas versões de vetores de entrada de expressão de hpRNA foram construídas para cada um de Caf1-180 e VatpaseC. Em uma primeira versão dos vetores de entrada, uma sequência de contexto de início traducional de consenso do milho estava presente na sequência líder não traduzida 5' de mRNA, adjacente à extremidade 5' da primeira sequência de fragmento de gene alvo, que estava presente na orientação "direta" (que está na orientação senso em relação ao promotor). A sequência de início traducional de consenso do milho foi omitida em uma segunda versão.

[00255] Uma reação de recombinação GATEWAY® padrão foi realizada com 3 vetores de entrada e um vetor de destinação (pDAB104124) usando LR CLONASE II PLUS™ da Invitrogen. Em um vetor de expressão de hpRNA concluído, o cassete de hpRNA foi flanqueado pelos cassetes de expressão de gene YFP e PAT.

[00256] A purificação do fragmento para a transformação mediada por WHISKERS™ foi realizada em uma escala preparativa por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) depois que os DNAs do vetor de expressão YFP/hpRNA/PAT foram digeridos com Bcl I (para construções de Caf1-180) ou Bbs I mais Afe I (para construções de VapaseC) para remover o gene resistente à espectinomicina bacteriana presente na cadeia principal do vetor.

Construção de vetores de transformação de planta - Método 2

Vetor de destinação WHISKERS™: A metodologia de clonagem GATEWAY® de sítio único padrão (INVITROGEN) foi usada para construir um vetor de expressão de RNA do tipo grampo de cabelo (hpRNA) para transformação celular do milho mediada por WHISKERS™. Dois genes marcadores foram incorporados em um vetor de destinação (denominado pDAB108916) e foram utilizados para triagem e seleção de células do milho depois da transformação. Um gene de proteína fluorescente amarela (YFP, Shagin *et al.* (2004) Mol. Biol. Evol. 21(5):841-50) foi usado para triagem visual, e um gene de tolerância a herbicida (fosfotricina acetil transferase (PAT), Wehrmann *et al.* (1996) Nat. Biotechnol. 14(10):1274-8) foi usado para a seleção dos transformantes. A expressão de cada um dos dois genes marcadores foi controlada por cópias separadas de um promotor de badnavírus baciliforme da cana-de-açúcar (SCBV) (Patente U.S. 6.489.462) compreendendo uma sequência 5'UTR quimérica montada a partir de uma porção do 5'UTR do gene de proteína de revestimento de vírus da risca do milho (Acesso no GENBANK X01633) e íntron 1 de um gene de álcool desidrogenase 1 do milho (Acesso no GENBANK X04049). Um fragmento compreendendo um 3'UTR de um gene de lipase do milho (ZmLip 3' UTR; Patente U.S. 7.179.902) e um fragmento compreendendo um 3'UTR de StPinII 3'UTR de batata (*Solanum tuberosum*) (An *et al.* (1989) Plant Cell. 1:115-122) foram usados para terminar a

transcrição dos genes YFP e PAT, respectivamente.

[00257] Um primeiro vetor de entrada designado para a produção de hpRNA foi construído utilizando fragmentos de DNA que portam um sentido v3 de Caf1-180 (íntron de +ST-LS1) (SEQ ID NO: 95) e fragmentos que portam uma sequência antissenso v3 de Caf1-180 (SEQ ID NO: 96). Estes fragmentos foram separadamente sintetizados por um fornecedor comercial (DNA2.0; Menlo Park, CA). Os pedaços sintéticos foram unidos em orientação apropriada por métodos de clonagem padrão para formar a construção de formação de grampo de cabelo da SEQ ID NO: 97, e a construção foi clonada entre um promotor e a sequência 3'UTR no vetor de entrada. A produção do transcrito de mRNA primário foi conduzida por uma cópia do promotor de ubiquitina 1 do milho (Patente U.S. 5.510.474), enquanto uma sequência compreendendo uma região 3' não traduzida de um gene de peroxidase 5 do milho (ZmPer5 3' UTR v2, Patente U.S. 6.699.984) foi usada para terminar a transcrição do fragmento de gene alvo. A formação de grampo de cabelo intramolecular por transcritos primários de RNA foi facilitada arranjando-se (dentro de uma única unidade de transcrição) duas cópias do fragmento de gene alvo em orientação oposta uma à outra, os dois fragmentos sendo separados por uma sequência de íntron de ST-LS1 (Vancanneyt *et al.* (1990) Mol. Gen. Genet. 220(2):245-50). Assim, o transcrito de mRNA primário contém as duas sequências de fragmento de gene como repetições invertidas grandes entre si, separadas pela sequência de íntron.

[00258] Uma reação de recombinação GATEWAY® padrão foi realizada com o pDAB108916 de vetor de entrada e vetor de destinação de grampo de cabelo v3 Caf-180 construído, usando LR CLONASE II PLUS™ da INVITROGEN. Em um vetor de expressão de hpRNA v3 de Caf-180 concluído (pDAB109830), o cassete de expressão do gene YFP foi flanqueado pelos cassetes de expressão do gene hpRNA e

PAT.

[00259] Em forma similar, métodos de clonagem GATEWAY® de sítio único padrão foram usados para construir outros vetores de expressão de RNA do tipo grampo de cabelo (hpRNA) para a transformação celular do milho mediada por WHISKERS™. Estes vetores adicionais compreenderam construções de hpRNA para VatpaseC v3, VatpaseC v4, VatpaseH v1 e Rho1 v1.

[00260] Um segundo vetor de entrada designado para a produção de hpRNA foi construído utilizando fragmentos sintéticos compreendendo uma sequência senso v3 de VatpaseC (íntron de +ST-LS1) (SEQ ID NO: 98) e uma sequência antissenso v3 de VatpaseC (SEQ ID NO: 99), unidos em orientação apropriada (SEQ ID NO: 100) pelos métodos de clonagem padrão. O vetor de entrada v3 de VaptaseC foi usado para clonagem GATEWAY® com o vetor de destinação (pDAB108916) para construir o vetor de expressão de hpRNA v3 de VatpaseC pDAB109828.

[00261] Um terceiro vetor de entrada designado para a produção de hpRNA foi construído utilizando fragmentos sintéticos compreendendo uma sequência senso v4 de VatpaseC (íntron de +ST-LS1) (SEQ ID NO: 101) e uma sequência antissenso v4 de VatpaseC (SEQ ID NO: 102), unidos em orientação apropriada (SEQ ID NO: 103) pelos métodos de clonagem padrão. O vetor de entrada v4 de VatpaseC foi usado para clonagem GATEWAY® com o vetor de destinação (pDAB108916) para construir o vetor de expressão de hpRNA v4 de VatpaseC pDAB109838.

[00262] Um quarto vetor de entrada designado para a produção de hpRNA foi construído utilizando fragmentos sintéticos compreendendo uma sequência senso v1 de VatpaseH (íntron de +ST-LS1) (SEQ ID NO: 104) e uma sequência antissenso v1 de Vatpase H (SEQ ID NO: 105), unidos em orientação apropriada (SEQ ID NO: 106) pelos méto-

dos de clonagem padrão. O vetor de entrada v1 de VatpaseH foi usado para clonagem GATEWAY® com o vetor de destinação (pDAB108916) para construir o vetor de expressão de hpRNA v1 de VatpaseH pDAB109829.

[00263] Um quinto vetor de entrada designado para a produção de hpRNA foi construído utilizando fragmentos sintéticos compreendendo uma sequência senso v1 de Rho1 (intron de +ST-LS1) (SEQ ID NO: 107) e uma sequência antissenso v1 de Rho1 (SEQ ID NO: 108), unidos em orientação apropriada (SEQ ID NO: 109) pelos métodos de clonagem padrão. O vetor de entrada v1 de Rho1 foi usado para clonagem GATEWAY® com o vetor de destinação (pDAB108916) para construir vetor de expressão de hpRNA v1 de Rho1 pDAB109834.

[00264] A transformação mediada por WHISKERS™ foi realizada usando DNA plasmídico circular purificado. EXEMPLO 9.

Vetor de destinação de *Agrobacterium*: Métodos de clonagem GATEWAY® padrão (INVITROGEN) foram usados para construir vetores de expressão de RNA do tipo grampo de cabelo (hpRNA) para transformação do embrião do milho mediada por *Agrobacterium*. Vetores de entrada preparados acima para a produção de hpRNAs para v3 de Caf-180, v3 de VatpaseC, v1 de VatpaseH e v1 de Rho1 foram usados para clonagem GATEWAY® com um vetor de destinação (pDAB108915) construído como um vetor binário de transformação de planta de *Agrobacterium*. Entre as sequências de repetição de margem de T-DNA esquerda e direita foi incluído um gene marcador selecionável da planta/de tolerância a herbicida compreendendo a sequência de codificação para a proteína AAD1 (Patente U.S. 7.838.733) sob o controle transcricional do promotor de SCBV como descrito acima. A terminação da transcrição e poliadenilação dos mRNAs de *aad1* foram determinadas por um 3'UTR de lipase do milho, essencialmente como divulgado como bases 921 a 1277 do Acesso no GENBANK™

Nº gb|L35913.1|MZELIPASE e na Patente U.S. 7.179.902. Os vetores de expressão binários de hpRNA resultantes foram denominados pDAB109817 (para v3 de Caf-180), pDAB109815 (para v3 de VapaseC), pDAB109816 (para v1 de VapaseH) e pDAB109821 (para v1 de Rho1).

[00265] Para a transformação do milho, os vetores de expressão binários de hpRNA foram introduzidos na cepa de *Agrobacterium tumefaciens* desarmada DAt13192, como descrito no Pedido Internacional PCT Nº PCT/US11/046028 depositado em 29 de Julho de 2011, que é por meio desta incorporado aqui em sua totalidade.

Exemplo 5: Triagem de genes alvos candidatos

[00266] dsRNA sintético designado para inibir algumas, mas nem todas, sequências de gene alvo identificadas no Exemplo 2 causou mortalidade e inibição do crescimento quando administrado a WCR em ensaios com base na dieta. Caf1-180; VapaseC; VapaseH; e Rho1 foram observados exibir eficácia muito aumentada neste ensaio sobre outros dsRNAs triados.

[00267] Bioensaios replicados demonstraram que a ingestão de construções transcritas em dsRNA de Caf1-180 (SEQ ID NO: 110); dsRNA de região 1 de VapaseC (SEQ ID NO: 111); dsRNA curto de região 1 de VapaseC (SEQ ID NO: 112); dsRNA de região 2 de VapaseC (SEQ ID NO: 113); dsRNA de região 1 de VapaseH (SEQ ID NO: 114); dsRNA de região 2 de VapaseH (SEQ ID NO: 115); e dsRNA de Rho1 (SEQ ID NO: 116) todos resultaram na mortalidade e inibição do crescimento surpreendentemente robustas de larvas de crisomélídeo do milho ocidental. As Tabelas 3 e 4 mostram os resultados de bioensaios de alimentação com base na dieta de larvas de WCR a seguir da exposição de 9 dias a estes dsRNAs. As FIGs. 2 a 4 mostram gráficos de variabilidade para a mortalidade e inibição do crescimento de pragas de coleópteros tratadas com moléculas de ácido nucleico exemplares.

Tabela 3. Resultados de bioensaios de alimentação com base na dieta de crisomelídeo do milho ocidental (depois de 9 dias de alimentação).

Nome da Amostra	LC ₅₀	Faixa de LC ₅₀	LC ₈₀	Faixa de LC ₈₀	GI ₅₀	Faixa de GI ₅₀	GI ₈₀	Faixa de GI ₈₀
Cafl-180	106*	38-308	ND**	ND	22	6-79	558	72-1000+
região 1 de VatpaseC	9	0,14-83	ND	ND	1,8	0,4-9,3	20	1,2-344
região 1 de VatpaseC curta	13,4	3,6-45	ND	ND	<1,0		33	2-250+
região 2 de VatpaseC	2,7	0,18-11,5	>1000	ND	5,1	0,4-68,4	87	0,53-1000+
região 1 de VatpaseH	2	0,5-4,6	357	91-1000+	1,7	0,9-3,0	11	4,0-30
região 2 de VatpaseH	0,70	0,04-2,83	168	40-1000+	3,2	1,3-7,7	13,9	2,6-72,7

*Unidades de dose são ng/cm²

**ND = não determinado

Tabela 4. Resultados de bioensaios de alimentação com base na dieta de crisomelídeo do milho ocidental (depois de 9 dias de alimentação).

Nome da Amostra	Dose(ng/cm ²)	% média de Mortalidade	GI médio
Rho1	1000	84*	0,824
Tampão de TE	0	29,5	0
Água	0	31	0
	LC ₅₀	Faixa de LC ₅₀	GI ₅₀
Rho1	302	92-1000+	<4,0

*contagens de mortalidade de Rho1 significativamente diferentes de contagens de tampão de TE ou Água (Razão de verossimilhança P < 0,0001)

[00268] Foi previamente sugerido que certos genes de *Diabrotica* spp. podem ser explorados para o controle de inseto mediado por RNAi. Ver Publicação de Patente U.S. Nº 2007/0124836, que divulga 906 sequências, e Patente U.S. 7.614.924, que divulga 9.112 sequên-

cias. Entretanto, foi determinado que muitos genes sugeridos a ter utilidade para controle de inseto mediado por RNAi não são eficazes em controlar *Diabrotica*. Também foi determinado que Caf1-180, VatpaseC, VatpaseH, e Rho1 todos fornecem controle superior surpreendente e inesperado de *Diabrotica*, comparado a outros genes sugeridos a ter utilidade para controle de inseto mediado por RNAi.

[00269] Anexina, beta espectrina 2, e mtRP-L4 foram todos sugeridos na Patente U.S. 7.614.924 para serem eficazes no controle de inseto mediado por RNAi. A SEQ ID NO: 51 é a sequência de DNA da região 1 de anexina, e SEQ ID NO: 52 é a sequência de DNA da região 2 de anexina. A SEQ ID NO: 53 é a sequência de DNA da região 1 de beta espectrina 2, e SEQ ID NO: 54 é a sequência de DNA da região 2 de beta espectrina 2. A SEQ ID NO: 55 é a sequência de DNA da região 1 de mtRP-L4, e a SEQ ID NO: 56 é a sequência de DNA da região 2 de mtRP-L4. Uma sequência de YFP (SEQ ID NO: 57) também foi usada para produzir dsRNA como um controle negativo.

[00270] Cada uma destas sequências foi usada para produzir dsRNA pelos métodos do Exemplo 4, e os dsRNAs foram todos testados pelos mesmos métodos de bioensaio com base na dieta descritos acima. A Tabela 5 lista as sequências dos iniciadores usados para produzir as moléculas de dsRNA de anexina, beta espectrina 2, e mtRP-L4. A Tabela 6 apresenta os resultados de bioensaios de alimentação com base na dieta de larvas de WCR a seguir da exposição de 9 dias a estas moléculas de dsRNA. Bioensaios replicados demonstraram que a ingestão destes dsRNAs não resultou em nenhuma mortalidade ou inibição do crescimento de larvas de crisomélideo do milho ocidental acima daquela observada com amostras de controle de tampão de TE, YFP, ou água.

Tabela 5. Sequências e pareamentos de iniciadores usados para ampliar regiões de gene de anexina, beta espectrina 2, mtRP-L4, e YFP

para a síntese de dsRNA.

	Gene (Região)	ID do Iniciador	SEQ ID NO:	Sequência
Par 20	Anexina (1)	Ann-F1T7	SEQ ID NO: 58	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAG CTCCAACAGTGGTTCCTTATC
	Anexina (1)	Ann-R1	SEQ ID NO: 59	CTAATAATTCTTTTTTAATGTTCTG AGG
Par 21	Anexina (1)	Ann-F1	SEQ ID NO: 60	GCTCCAACAGTGGTTCCTTATC
	Anexina (1)	Ann-R1T7	SEQ ID NO: 61	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTA ATAATTCTTTTTTAATGTTCTGAGG
Par 22	Anexina (2)	Ann-F2T7	SEQ ID NO: 62	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAT TGTTACAAGCTGGAGAACT TCTC
	Anexina (2)	Ann-R2	SEQ ID NO: 63	CTTAACCAACAACGGCTAATAAGG
Par 23	Anexina (2)	Ann-F2	SEQ ID NO: 64	TTGTTACAAGCTGGAGAACTTCTC
	Anexina (2)	Ann-R2T7	SEQ ID NO: 65	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAC TTAACCAACAACGGCTAATAAGG
Par 24	B-spect2 (1)	Betasp2-F1T7	SEQ ID NO: 66	TTAATACGACTCACTATAGGGAGA AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA
	B-spect2 (1)	Betasp2-R1	SEQ ID NO: 67	GTCCATTCGTCCATCCACTGCA
Par 25	B-spect2 (1)	Betasp2-F1	SEQ ID NO: 68	AGATGTTGGCTGCATCTAGAGAA
	B-spect2 (1)	Betasp2-R1T7	SEQ ID NO: 69	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAG TCCATTCGTCCATCCACT GCA
Par 26	B-spect2 (2)	Betasp2-F2T7	SEQ ID NO: 70	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAG CAGATGAACACCAGCGAG AAA
	B-spect2 (2)	Betasp2-R2	SEQ ID NO: 71	CTGGGCAGCTTCTTGTTCCTC
Par 27	B-spect2 (2)	Betasp2-F2	SEQ ID NO: 72	GCAGATGAACACCAGCGAGAAA

	B-spect2 (2)	Betasp2-R2T7	SEQ ID NO: 73	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTG GGCAGCTTCTTGTTCCTC
Par 28	mtRP-L4 (1)	L4-F1T7	SEQ ID NO: 74	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAA GTGAAATGTTAGCAAATATAACATC C
	mtRP-L4 (1)	L4-R1	SEQ ID NO: 75	ACCTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG
Par 29	mtRP-L4 (1)	L4-F1	SEQ ID NO: 76	AGTGAAATGTTAGCAAATATAACATCC
	mtRP-L4 (1)	L4-R1T7	SEQ ID NO: 77	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAC- CTCTCACTTCAAATCTTGACTTTG
Par 30	mtRP-L4 (2)	L4-F2T7	SEQ ID NO: 78	TTAATACGACTCACTATAGGGAGA- CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT
	mtRP-L4 (2)	L4-R2	SEQ ID NO: 79	CTACAAATAAAACAAGAAGGACCCC
Par 31	mtRP-L4 (2)	L4-F2	SEQ ID NO: 80	CAAAGTCAAGATTTGAAGTGAGAGGT
	mtRP-L4 (2)	L4-R2T7	SEQ ID NO: 81	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACTA CAAATAAAACAAGAAGGACCCC
Par 32	YFP	YFP-FT7	SEQ ID NO: 82	TTAATACGACTCACTATAGGGAGACA- CCATGGGCTCCAGCGGCGCCC
	YFP	YFP-R	SEQ ID NO: 83	AGATCTTGAAGGCGCTCTTCAGG
Par 33	YFP	YFP-F	SEQ ID NO: 84	CACCATGGGCTCCAGCGGCGCCC
	YFP	YFP-RT7	SEQ ID NO: 85	TTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGA TCTTGAAGGCGCTCTTCAGG

Tabela 6. Resultados de bioensaios de alimentação com base na dieta de dsRNA de larvas de crisomelídeo do milho ocidental (depois de 9 dias de alimentação).

NOME DO GENE	DOSE (NG/CM ²)	PESO MÉDIO POR INSETO (MG)	% MORTALIDADE MÉDIA	INIBIÇÃO MÉDIA DO CRESCIMENTO
Região 1 de anexina	1000	0,545	0	-0,262
Região 2 de anexina	1000	0,565	0	-0,301
Região 1 de beta espectrina 2	1000	0,340	12	-0,014
Região 2 de beta espectrina 2	1000	0,465	18	-0,367
Região 1 de mtRP-L4	1000	0,305	4	-0,168
Região 2 de mtRP-L4	1000	0,305	7	-0,180
Tampão de TE	0	0,430	13	0,000
Água	0	0,535	12	0,000
YFP	1000	0,480	9	-0,386

Exemplo 6: Efeitos do comprimento da sequência sobre a eficácia do dsRNA de VatpaseC

[00271] dsRNAs da subunidade C de ATPase vacuolar (VatpaseC) variando em tamanho de 349 a 500 pb foram ativos em ensaios de alimentação com base na dieta contra larvas de crisomelídeo do milho ocidental. Tabela 3. Para determinar a dependência do comprimento da eficácia de moléculas de dsRNA, os comprimentos dos dsRNAs de Vatpase C foram variados e testados. As sequências foram escolhidas para representar as 15, 25, 50 e 100 bases no terminal 5', e as 100, 50, 25, e 15 bases no terminal 3' de um segmento de 174 pares de base da sequência de codificação de VatpaseC (SEQ ID NO: 2).

[00272] Fragmentos de dsRNA representando as sequências de VatpaseC 5' e 3' de 15 pb e 25 pb foram sintetizados por um fornece-

dor comercial (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES; Coralville, IA). Tabela 7. Os fragmentos de dsRNA 5' e 3' de 50 pb e 100 pb, e o fragmento de dsRNA de 174 pb de tamanho natural, foram gerados dos padrões de DNA ampliados por PCR usando T7 RNA polimerase seguindo as instruções de um kit de RNAi MEGAscript™ (AMBION®, Foster City, CA) usando os iniciadores listados na Tabela 8. As combinações de iniciadores usados para ampliar os vários comprimentos de padrões de DNA são listadas na Tabela 9.

Tabela 7. RNAs sintéticos designados para servir como dsRNAs de VatpaseC de 15 pb e 25 pb (extremidades cegas).

Nome do dsRNA	Sequência de fita senso (5' a 3')	Identificador de sequência
VatpaseC5'-15	AUGACUGAGUAUUGG	SEQ ID NO: 117
VatpaseC5'-25	AUGACUGAGUAUUGGUUGAUUCUG	SEQ ID NO: 118
VatpaseC3'-15	CUUUCUGAUGAUCUG	SEQ ID NO: 119
VatpaseC3'-25	GUUAGUAGGACUUCUGAUGAUCUG	SEQ ID NO: 120

Tabela 8. Iniciadores de PCR usados para gerar vários comprimentos de padrões de DNA de VatpaseC compreendendo uma sequência promotora de T7 (sublinhada) para a síntese de dsRNA.

Nome do Iniciador	Sequência de iniciador	SEQ ID Nº	Filamento
VatpaseC-FT7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> ATGA CTGAGTATTGGTTGATATCTGC	SEQ ID NO: 121	sentido
VatpaseC-R50T7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGATGTT</u> GACAGGTCTTATCCCCT	SEQ ID NO: 122	anti-sentido
VatpaseC-R100T7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGATTGA</u> CAAATTATTCTGTTACTTGTCATAT	SEQ ID NO: 123	anti-sentido
VatpaseC-RT7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGACAGA</u> TCATCAGAAAGTCCTACTAAGT	SEQ ID NO: 124	anti-sentido
VatpaseC-F50T7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACT</u> TGAAAGTTGGTACTCTGGAT	SEQ ID NO: 125	sentido
VatpaseC-F100T7	<u>TTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACA</u> AGTAAACAGAATAATTTGTCAACC	SEQ ID NO: 126	sentido

Tabela 9. Combinações de iniciador usadas em PCR para gerar padrões de DNA de VapaseC para a síntese de vários comprimentos de dsRNA.

Nome do dsRNA	Par do Iniciador	Comprimento do amplicon (pb)*	Comprimento do dsRNA (pb)**	Ponto de partida para o comprimento
VapaseC5'-50	VapaseC-FT7 & VapaseC-R50T7	$50 + 48 = 98$	$50 + 12 = 62$	extremidade 5'
VapaseC5'-100	VapaseC-FT7 & VapaseC-R100T7	$100 + 48 = 148$	$100 + 12 = 112$	extremidade 5'
VapaseC-174	VapaseC-FT7 & VapaseC-RT7	$174 + 48 = 222$	$174 + 12 = 186$	extremidade 5'
VapaseC3'-50	VapaseC-F50T7 & VapaseC-RT7	$51 + 48 = 99$	$51 + 12 = 63$	extremidade 3'
VapaseC3'-100	VapaseC-F100T7 & VapaseC-RT7	$100 + 48 = 148$	$100 + 12 = 112$	extremidade 3'

* sequência promotora de T7 (24 pb) adicionada na extremidade 5' de ambos os iniciadores, resultando na adição de 48 pb aos amplicons.

** GGGAGA da sequência promotora de T7 é adicionado na extremidade 5' de ambas as fitas de dsRNA durante a transcrição, resultando na adição de 12 pb aos transcritos.

[00273] dsRNAs de VapaseC (isto é, VapaseC 5'-15, VapaseC 5'-25, VapaseC 5'-50, VapaseC 5'-100, VapaseC 3'-15, VapaseC 3'-25, VapaseC 3'-50, VapaseC 3'-100, e VapaseC-174) foram todos testados em uma única dose (1000 ng/cm²) quanto à atividade (letalidade) usando ensaios de alimentação com base na dieta com larvas de crisomelídeo do milho ocidental. Como mostrado na **Tabela 10**, as atividades destas amostras de dsRNA (como medido pela mortalidade percentual larval no dia 9 de alimentação) são diferentes. A alimenta-

ção das amostras de dsRNA de VapaseC de 15 pb e 25 pb (tanto 5' quanto 3') não induziu nenhuma mortalidade larval significativa, que é um resultado similar ao controle negativo usando dsRNA de YFP. Entretanto, tanto os dsRNAs de VapaseC 5' e 3' de 100 pb, quanto os dsRNAs de VapaseC 5' e 3' de 174 pb, resultaram em mortalidade larval alta similarmente inesperada. As duas amostras de dsRNA de 50 pb mostraram resultados diferentes nos ensaios de alimentação; a amostra de dsRNA de VapaseC5'-50 não resultou em nenhuma mortalidade larval significativa, mas mostrou retardo do desenvolvimento significativo, ao passo que a amostra de dsRNA de VapaseC3'-50 causou quase 60 % de mortalidade, que é um nível quase tão alto quanto os valores obtidos com as amostras de dsRNAs de 100 pb e 174 pb. **Tabela 10.**

[00274] Além disso, as atividades dos dsRNAs de VapaseC foram determinadas em seis doses de teste (1,0, 3,9, 62,5, 250, e 1000 ng/cm²) para obter valores de LC₅₀ e GI₅₀ relativos. **Tabela 11.** O valor de LC₅₀ obtido com a amostra de VapaseC 3'-100 foi 3,01 ng/cm², que foi o menor valor observado (isto é, a potência mais alta). De nota particular é o valor de LC₅₀ de 9,81 ng/cm² obtido com a amostra de VapaseC-174. A construção designada para produzir um grampo de cabelo em v4 de VapaseC em plantas do milho mostrou atividade quando testada com plantas cultivadas em estufa. Exemplo 10; **Tabela 18.** Este fragmento de sequência v4 de VapaseC (166 pb) é quase idêntico à sequência de VapaseC-174 descrita aqui; a sequência de VapaseC-174 descrita aqui carece apenas de 8 pb (ATGACTGA) na extremidade 5' do fragmento de sequência v4 de VapaseC de 166 pb.

Tabela 10. Resultados de bioensaios de alimentação com base na dieta de dsRNA de larvas de crisomélídeo do milho ocidental (depois de 9 dias de alimentação) utilizando diferentes comprimentos de dsRNA de VapaseC em 1000 ng/cm².

Amostra	Repetições	% média de mortalidade	% média de inibição do crescimento (GI)
VatpaseC 3'-15	4	12,33 B*	10,28 BC**
VatpaseC 3'-25	4	6,07 B	-28,85 C
VatpaseC 3'-50	4	59,38 A	83,60 A
VatpaseC 3'-100	4	69,76 A	84,43 A
VatpaseC-174	2	67,65 A	84,70 A
VatpaseC 5'-15	4	2,94 B	11,50 BC
VatpaseC 5'-25	4	5,00 B	6,90 BC
VatpaseC 5'-50	4	19,12 B	54,75 AB
VatpaseC 5'-100	4	73,53 A	88,75 A
VatpaseC-174	4	71,60 A	83,00 A
YFP (controle neg.)	6	10,12 B	0,09 BC

* valores de % média de mortalidade seguido pela mesma letra não são significativamente diferentes um do outro no nível de $P = 0,05$ (como calculado por comparação de ANOVA/Tukey das médias). Valores de mortalidade para controles negativos sem dsRNA (tampão de TE, e água) foram menores do que 20 % e não são mostrados.

** valores de % média de GI seguido pela(s) mesma(s) letra(s) não são significativamente diferentes um do outro no $P = 0,05$ (calculado pela comparação de ANOVA/Tukey das médias). O peso larval das larvas alimentadas com dsRNA de YFP de controle negativo foi usado como a base para o cálculo de GI.

Tabela 11. Valores de LC_{50} e GI_{50} para diferentes comprimentos de dsRNA de VatpaseC fornecidos em 1,0, 3,9, 62,5, 250, e 1000 ng/cm² a larvas de crisomelídeo do milho ocidental (depois de 9 dias de alimentação).

Amostra	Repetições	LC_{50} (ng/cm ²)	GI_{50} (ng/cm ²)
VatpaseC3'-50	4	144,88	9,56
VatpaseC3'-100	4	3,01	0,25

VatpaseC5'-100	4	17,49	0,85
VatpaseC-174	4	9,81	0,23

Exemplo 7: Efeitos da variação de sequência de dsRNA sobre a eficácia de dsRNA de VatpaseC

[00275] Moléculas de dsRNA que não são perfeitamente complementares a uma sequência alvo (por exemplo, tendo apenas 95 % de identidade ao mRNA alvo) são eficazes para controlar pragas de coleópteros. Bases não complementares foram introduzidas no filamento senso ou na fita antissenso de dsRNAs de VatpaseC, resultando em disparidades entre as fitas senso e antissenso do dsRNA (e consequentemente, resultando em disparidades entre o dsRNA e o mRNA alvo *in vivo*). Os efeitos sobre a atividade inseticida dos dsRNAs imperfeitamente emparelhados contra larvas de crisomelídeo do milho ocidental foram medidos em bioensaios com base na dieta.

[00276] Apenas uma das duas fitas de DNA que codificam um dsRNA de VatpaseC foi mutada em um momento, e um único nucleotídeo não complementar foi artificialmente introduzido em cada sítio de mutação. Os sítios de mutação foram arbitrariamente posicionados em intervalos de 20 nucleotídeos ao longo do comprimento inteiro da fita mutada de um DNA que codifica um dsRNA de VatpaseC. A identidade do nucleotídeo escolhido para substituir o nativo foi fabricada dos nucleotídeos proximais em qualquer lado do sítio de mutação que não complementou o nucleotídeo na fita não mutada oposta ao sítio de mutação. Para a eventualidade de que três ou mais nucleotídeos foram os mesmos em um local dado, o nucleotídeo diferente mais próximo foi selecionado para substituir o nativo.

[00277] Dois dsRNAs de VatpaseC (v4) imperfeitamente complementares, substancialmente homólogos (isto é, v4.1 e v4.2) foram designados, gerados, e testados quanto à atividade inseticida. Ambos os dsRNAs compreenderam 166 pb de uma sequência v4 de VatpaseC,

mais seis nucleotídeos (GGGAGA) na extremidade 5' de cada fita de RNA que são artefatos de transcrição pelo promotor de T7. Assim, o comprimento total de cada dsRNA foi 178 pb.

[00278] O dsRNA substancialmente homólogo de v4.1 de *VatpaseC* foi designado e gerado com bases não complementares introduzidas na fita antissenso. Este dsRNA foi obtido pelas etapas seguintes: (1) Uma sequência de fita antissenso foi designada para ter uma mutação introduzida em cada 20 nucleotídeos; (2) fragmentos de DNA compreendendo a sequência de DNA de fita antissenso mutada ou uma sequência de DNA de fita senso nativa (isto é, sem mutações) foram quimicamente sintetizados (IDT); (3) oligonucleotídeos de DNA compreendendo a fita antissenso mutada e oligonucleotídeos compreendendo a fita senso foram recozidos para formar moléculas de fita dupla; (3) ampliação por PCR utilizando iniciadores compreendendo sequências promotoras de T7 de terminal 5' foi usada para incorporar a sequência promotora de T7 nas extremidades 5' de ambos os filamentos, deste modo fornecendo um padrão suficiente para a síntese de dsRNA; e (4) síntese de dsRNA foi realizada usando T7 RNA polimerase e um kit de RNAi AMBION® MEGAscript™, de acordo com as instruções do fabricante.

[00279] O dsRNA substancialmente homólogo v4.2 de *VatpaseC*, tendo mutações introduzidas em intervalos de 20 bases na sequência de fita senso (mas tendo uma sequência de fita antissenso nativa), foi obtido por modificações apropriadas dos métodos acima. Além disso, um dsRNA v4 de *VatpaseC* compreendendo a sequência nativa (isto é, tendo fitas senso e antissenso perfeitamente complementares) foi construído, e usado como um controle para comparação de eficácia com os dsRNAs substancialmente homólogos v4.1 e v4.2 de *VatpaseC* em ensaios de alimentação com base na dieta contra larvas de crisomelídeo do milho ocidental (conduzidos usando métodos previa-

mente descritos).

[00280] Sete doses destes dsRNAs (0,2, 1,0, 3,9, 15,6, 62,5, 250, e 1000 ng/cm²) foram testadas em bioensaios de alimentação com larvas de primeiro instar de crisomelídeo do milho ocidental para obter valores de LC₅₀ e GI₅₀. Os ensaios foram independentemente conduzidos duas vezes, e cada experimento teve duas repetições.

[00281] A LC₅₀ calculada para o dsRNA v4.1 de VatpaseC substancialmente homólogo (fita antissenso mal combinada) foi 780,9 ng/cm², que é 7,9 vezes mais alta do que a LC₅₀ obtida para o dsRNA v4 de VatpaseC nativo (isto é, não mutado). **Tabela 12.** Este resultado indica que, ainda que a fita antissenso de 178 bases do dsRNA v4.1 de VatpaseC contivesse 8 bases mutadas, homologia suficiente à fita de mRNA alvo de praga de coleóptero existiu para induzir um efeito letal a seguir da ingestão do dsRNA. O valor de LC₅₀ calculado para o dsRNA v4.2 de VatpaseC substancialmente homólogo (fita senso mal combinada) foi 868,6 ng/cm², que é similar ao valor obtido com v4.1 de VatpaseC, e 8,8 vezes mais alto do que aquele obtido nestes ensaios para o dsRNA v4 de VatpaseC. Estes resultados demonstram que dsRNAs substancialmente homólogos compreendendo disparidades na fita senso do dsRNA mantêm homologia suficiente a um filamento de mRNA alvo de praga de coleóptero para induzir um efeito letal a seguir da ingestão do dsRNA. Foi descoberto ainda que nestes ensaios de alimentação os dsRNAs v4.1 e v4.2 de VatpaseC tiveram valores de GI₅₀ que foram mais altos do que o valor calculado para o dsRNA v4 de VatpaseC nativo (isto é, não mutado). **Tabela 12.** Portanto é observado que dsRNAs v4.1 e 4.2 de VatpaseC são capazes de induzir tanto inibição do crescimento melhorada quanto mortalidade melhorada na ingestão por uma praga de coleóptero.

Tabela 12. Atividade inseticida de dsRNAs de VatpaseC substancialmente homólogos (v4.1 e v4.2), e dsRNA v4 de VatpaseC nativo con-

tra larvas de crisomelídeo do milho ocidental.

dsRNA	Repetições	LC ₅₀ (ng/cm ²)	Aumento de LC ₅₀ (vezes)	GI ₅₀ (ng/cm ²)	Aumento de GI ₅₀ (vezes)
VatpaseC v4	8	98,5	NA	0,16	NA
VatpaseC v4.1	4	780,9	7,9	7,50	47,7
VatpaseC v4.2	4	868,6	8,8	0,84	5,4

Exemplo 8: Produção mediada por *Agrobacterium* de tecidos de milho transgênico compreendendo dsRNAs do tipo grampo de cabelo inseticidas

[00282] Esterilização da espiga e isolamento do embrião: Embriões de milho imaturos foram obtidos de plantas de linhagem pura de *Zea mays* B104 cultivadas na estufa e autopolinizadas ou polinizadas por uma planta do mesmo híbrido para produzir espigas. As espigas foram colhidas aproximadamente 9 a 12 dias após a polinização. No dia experimental, as espigas foram esterilizadas na superfície por imersão em uma solução a 20 % de hipoclorito de sódio (6,15 %), e agitadas durante 20 a 30 min, seguido por três enxágues em água estéril. Depois da esterilização, embriões zigóticos imaturos (1,5 a 2,4 mm) foram assepticamente dissecados de cada espiga, e aleatoriamente distribuídos em tubos de microcentrífuga contendo meio de inoculação líquido (2,2 gm/L de sais de MS (Frame *et al.*, 2011, *supra*); Vitaminas de MS Modificadas 1X ISU (Frame *et al.* (2011) "Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos," EM Plant Embryo Culture Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. T. A. Thorpe e E. C. Yeung, (Eds.), SPRINGER SCIENCE AND BUSINESS MEDIA, LLC., pp 327-341); 68,4 gm/L de sacarose; 36 gm/L de glicose; 115 mg/L de L-prolina; 100 mg/L de *mio*-inositol; e 200 µM de acetosiringona (preparado em DMSO); no pH 5,4). Para um conjunto de experimentos dado, os embriões de espigas agrupadas foram usados para cada transformação.

[00283] Iniciação da Cultura de *Agrobacterium*: Estoques de glicerol de cepa de *Agrobacterium* DAt13192 contendo os vetores de trans-

formação binários descritos acima no Exemplo 4 foram riscados sobre placas de meio mínimo AB (Watson *et al.* (1975) J. Bacteriol. 123:255-64) contendo antibióticos apropriados, e foram cultivados a 20° C durante 3 a 4 dias. Uma única colônia foi selecionada de cada placa, riscada sobre placas de YEP (10 gm/L de extrato de levedura; 10 gm/L de Peptona; e 5 gm/L de NaCl) contendo os antibióticos apropriados, e incubada a 20° C durante 1 a 2 dias.

[00284] Cultura e Cocultivo de *Agrobacterium*. Colônias de *Agrobacterium* foram tomadas de uma placa de YEP, colocadas em suspensão em 10 mL de Meio de Inoculação em um tubo descartável de 50 mL, e a densidade celular foi ajustada para uma OD₅₅₀ (Densidade Óptica medida em 550 nm) de 0,2 a 0,4 usando um espectrofotômetro. As culturas de *Agrobacterium* foram incubadas em um agitador rotativo em 125 rpm (temperatura ambiente) enquanto a dissecação do embrião foi realizada. Embriões zigóticos imaturos (previamente isolados das sementes de milho esterilizadas e colocados em 1 mL de Meio de Inoculação) foram lavados uma vez em Meio de Inoculação. 2 mL de suspensão de *Agrobacterium* foram adicionados a cada tubo de embriões, e os tubos foram colocados em uma plataforma agitadora durante entre 10 e 15 minutos. Os embriões foram transferidos sobre o Meio de Co-cultivação (4,33 gm/L de sais de MS; 1X ISU de Vitaminas de MS Modificadas; 30 gm/L de sacarose; 700 mg/L de L-prolina; 3,3 mg/L de Dicamba (ácido 3,6-dicloro-o-anísico ou ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico) em KOH; 100 mg/L de *myo*-inositol; 100 mg/L de Hidrilisado Enzimático de Caseína; 15 mg/L de AgNO₃; 100 µM de acetosiringona em DMSO; e 3 gm/L DE GELZAN™ (SIGMA-ALDRICH®); no pH 5,8), orientados com o escutelo faceando para cima, e incubados a 25°C, sob 24 horas de luz em intensidade luminosa de 50 µEm⁻² s⁻¹ durante 3 dias.

[00285] Seleção e Regeneração do Calo de Eventos Putativos: A

seguir do período de co-cultivação, os embriões foram transferidos para o Meio de Repouso (4,33 gm/L de sais de MS; 1X ISU de Vitaminas de MS Modificadas; 30 gm/L de sacarose; 700 mg/L de L-prolina; 3,3 mg/L de Dicamba em KOH; 100 mg/L de *mio*-inositol; 100 mg/L de Hidrolisado Enzimático de Caseína; 15 mg/L de AgNO₃; 0,5 gm/L de MES ácido (2-(N-morfolino) etanossulfônico mono-hidratado; PHYTO-TECHNOLOGIES LABORATORIES®, Lenexa, KS); 250 mg/L de Carbenicilina; e 2,3 gm/L de GELZAN™; no pH 5,8), e incubados sob 24 horas de luz em intensidade luminosa de 50 μEm⁻²s⁻¹ e a 25°C durante 3 dias.

[00286] Os embriões foram transferidos sobre o Meio de Seleção 1 (que consiste no Meio de Repouso (acima) com 100 nM de ácido R-Haloxifop (0,0362 mg/L)), e incubados na escuridão ou sob 24 horas de luz em intensidade luminosa de 50 μEm⁻²s⁻¹ durante 7 a 14 dias a 28° C. Calos embriogênicos proliferantes foram transferidos sobre o Meio de Seleção 2 (que consiste no Meio de Repouso (acima), com 500 nM de ácido R-Haloxifop (0,1810 mg/L)), e foram incubados em 24 horas de luz em intensidade luminosa de 50 μEm⁻²s⁻¹ durante 14 a 21 dias a 28° C. Esta etapa de seleção permitiu que o calo transgênico proliferasse e diferenciasse ainda mais.

[00287] Os calos embriogênicos, proliferantes foram transferidos sobre o Meio de Pré-Regeneração (4,33 gm/L de sais de MS; 1X ISU de Vitaminas de MS Modificadas; 45 gm/L de sacarose; 350 mg/L de L-prolina; 100 mg/L de *mio*-inositol; 50 mg/L de Hidrolisado Enzimático de Caseína; 1,0 mg/L de AgNO₃; 0,25 gm/L de MES; 0,5 mg/L de ácido naftalenoacético em NaOH; 2,5 mg/L de ácido abscísico em etanol; 1 mg/L de 6-benzilaminopurina; 250 mg/L de Carbenicilina; 2,5 gm/L de GELZAN™; e 500 nM de ácido R-Haloxifop; no pH 5,8), e cultivados sob 24 horas de luz em intensidade luminosa de 50 μEm⁻²s⁻¹ durante 7 dias a 28° C.

[00288] Os calos embriogênicos com embriões semelhantes a broto foram transferidos sobre o Meio de Regeneração I (4,33 gm/L de sais de MS; 1X ISU de Vitaminas de MS Modificadas; 60 gm/L de sacarose; 100 mg/L de *mio*-inositol; 125 mg/L de Carbenicilina; 3,0 gm/L de GELZAN™; e 500 nM de ácido R-Haloxifop; no pH 5,8), e cultivados sob 24 horas de luz em intensidade luminosa de 50 $\mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 7 dias.

[00289] Brotos pequenos com raízes primárias foram transferidos para o meio de Broto/Raiz (4,33 gm/L de sais de MS; 1X ISU de Vitaminas de MS Modificadas; 30 gm/L de sacarose; 100 mg/L de *mio*-inositol; 3,5 gm/L de GELZAN™; no pH 5,8) em PHYTATRAYS™ (PHYTOTECHNOLOGIES LABORATORIES®), e foram incubados sob 16:8 h de luz:escuridão de em intensidade luminosa de 140 a 190 $\mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 7 dias a 27° C. Plântulas transgênicas putativas foram analisadas quanto ao número de cópia de transgene, e transferidas para o solo.

[00290] Produção da semente: Plantas foram transplantadas em meio de cultivo sem terra METRO-MIX™ 360 (SUN GRO HORTICULTURE; Bellevue, WA), e endurecidas em um ambiente de crescimento. As plantas foram depois transplantadas em mistura de terra SUNSHINE CUSTOM BLEND™ 160, e cultivadas até a florescência na estufa. Polinizações controladas para a produção de semente foram conduzidas.

[00291] Bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental em plantas cultivadas em estufa foram conduzidos pelos métodos descritos no Exemplo 12. Plantas com uma classificação de raiz de 0,75 ou melhor foram transplantadas imediatamente para vasos de 5 galões (19 litros) para a produção das sementes. Transplantas foram tratados com inseticida para impedir dano ao crisomelídeo adicional e liberação do inseto nas estufas. Plantas B104 foram cruzadas com plantas B104 não

transgênicas (doadoras de pólen) para a produção de sementes. As sementes produzidas por estas plantas são preservadas para a avaliação nas gerações T₁ e subsequentes das plantas.

[00292] Cepa de *Agrobacterium* DA13192 compreendendo uma construção expressível da planta que codifica um dsRNA do tipo grampo de cabelo v3 de Caf1-180 (Exemplo 4; construção em plasmídeo pDAB109817) foi usada para produzir plantas transgênicas de milho B104. Bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental nestas plantas transgênicas cultivadas em estufa foram conduzidos pelos métodos descritos no Exemplo 12. Plantas transformadas com um plasmídeo similar (pDAB101556), que contém um gene para a produção de YFP mas não contém um gene para a produção de dsRNA, foram usadas como controles negativos. Os resultados destes bioensaios são mostrados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Resultados de bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental de eventos de milho transgênico B104 expressando um dsRNA do tipo grampo de cabelo v3 de Caf1-180.

Descrição do evento	Nº Total de Plantas Testadas	Nº de Plantas com Classificação de Raiz ≤0,5 (%)*	Nº de Plantas com Classificação de Raiz ≤0,75 (%)
hp dsRNA v3 de Caf1-180 (pDAB109817)	16	1 (6,3)	4 (25)
YFP (pDAB101556)	14	1 (7,1)	1 (7,1)
B104 não transgênica	16	2 (12,5)	3 (18,8)

*Escala de classificação do dano à raiz do milho: 0 a 1,0

[00293] Cepa de *Agrobacterium* DA13192 compreendendo uma construção expressível da planta que codifica um dsRNA do tipo grampo de cabelo v3 de VatpaseC (Exemplo 4; construção em plasmídeo pDAB109815) foi usada para produzir plantas transgênica de milho B104. Bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental nestas plantas transgênicas cultivadas em estufa foram conduzidos pelos mé-

todos descritos no Exemplo 12. Plantas transformadas com um plasmídeo similar (pDAB101556), que contém um gene para a produção de YFP mas não contém um gene para a produção de dsRNA, foram usadas como controles negativos. Os resultados destes bioensaios são mostrados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Resultados de bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental de eventos de milho transgênico B104 expressando um dsRNA do tipo grampo de cabelo v3 de VstpaseC.

Descrição do evento	Nº Total de Plantas Testadas	Nº de Plantas com Classificação de Raiz $\leq 0,5$ (%)*	Nº de Plantas com Classificação de Raiz $\leq 0,75$ (%)
Hp dsRNA v3 de VstpaseC (pDAB109815)	10	6 (60)	7 (70)
YFP (pDAB101556)	14	1 (7,1)	1 (7,1)
B104 não transgênica	16	2 (12,5)	3 (18,8)

*Escala de classificação do dano à raiz do milho: 0 a 1,0

[00294] Cepa de *Agrobacterium* DA13192 compreendendo uma construção expressível da planta que codifica um dsRNA do tipo grampo de cabelo v1 de VstpaseH (Exemplo 4; construção em plasmídeo pDAB109816) foi usada para produzir plantas transgênicas de milho B104. Bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental nestas plantas cultivadas em estufa foram conduzidos pelos métodos descritos no Exemplo 12. Plantas transformadas com um plasmídeo similar (pDAB101556), que contém um gene para a produção de YFP mas não contém um gene para a produção de dsRNA, foram usadas como controles negativos. Os resultados destes bioensaios são mostrados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Resultados de bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental de eventos de milho transgênico B104 expressando um dsRNA do tipo grampo de cabelo v1 de VstpaseH.

Descrição do evento	Nº Total de Plantas Testadas	Nº de Plantas com Classificação de Raiz $\leq 0,5$ (%)*	Nº de Plantas com Classificação de Raiz $\leq 0,75$ (%)
hp dsRNA v1 de VatpaseH (pDAB109816)	18	8 (44,4)	14 (77,8)
YFP (pDAB101556)	14	1 (7,1)	1 (7,1)
B104 não transgênica	16	2 (12,5)	3 (18,8)

*Escala de classificação do dano à raiz do milho: 0 a 1,0

Exemplo 9: Produção mediada por WHISKERS de tecidos de milho transgênico compreendendo dsRNAs do tipo grampo de cabelo v3 de Caf1-180 inseticidas

[00295] Plantas que produzem uma ou mais moléculas de dsRNA inseticidas (por exemplo, pelo menos uma molécula de dsRNA incluindo uma molécula de dsRNA alvejando um gene compreendendo uma das SEQ ID NOs: 1 a 4) através da expressão de um gene quimérico estavelmente integrado no genoma da planta foram produzidas. Moléculas de DNA para transformação de planta foram preparadas como descrito no Exemplo 4, e foram liberadas em células do milho em culturas de célula em suspensão Hi-II por intermédio de transformação mediada por WHISKERS (essencialmente como descrito nas Patentes U.S. 5.302.523 e 5.464.765; Publicação de Patente U.S. Nº 2008/0182332; e Petolino e Arnold (2009) M. Paul Scott (ed.) Methods in Molecular Biology: Transgenic Maize, Vol. 526, Humana Press, NY, pp 59-67), que são aqui incorporados por esta referência em sua totalidade.

[00296] Transformação e seleção de célula de planta: Todos os procedimentos para transformação mediada por WHISKERS foram realizados usando técnicas assépticas padrão, e geralmente seguiram os métodos descritos por Petolino e Arnold (2009), *supra*. Suspensões de célula embriogênica Hill de *Zea mays* (Armstrong *et al.* (1991) *Maize Genet. Coop. Newslett.* 65:92-3) foram subcultivadas transferindo-

se 30 mL de células em suspensão sedimentadas, mais 70 mL de meio condicionado (isto é, o meio em que as células foram cultivadas), em 200 mL de meios de H9CP frescos (4,33 gm/L de sais basais de MS (*PHYTOTECNOLOGIES LABORATORIES*, Cat # M524); 30,0 gm/L de Sacarose; 100,0 mg/L de Mio-inositol; 200 mg/L de Hidrolisado Enzimático de Caseína; 2,0 mg/L de ácido 2,4-diclorofenóxi acético; 2,0 mg/L de ácido naftalenoacético; 691 mg/L de L-Prolina; 2,0 mg/L de Glicina; 0,5 mg/L de HCl de Tiamina; 0,5 mg/L de HCl de Piridoxina; 0,05 mg/L de ácido nicotínico; no pH 6,0) contendo 5 % de água de coco (*SIGMA ALDRICH*, St. Louis, MO; Catálogo Nº C5915) em um tubo de centrífuga de fundo cônico descartável de 175 mL *NALGENE™* (*THERMO FISHER SCIENTIFIC*; Catálogo Nº 3145-0175). As células diluídas foram depois incubadas em um frasco de cultura celular descartável de 1 L estéril na escuridão a 28°C em um agitador giro-rotativo com um raio de deslocamento de uma polegada (2,54 cm) em 120 rpm, e as células foram subcultivadas a cada 3,5 dias como descrito acima.

[00297] Um dia a seguir da subcultura, e 18 a 24 h antes do procedimento de transfecção, 50 mL de meio H9CP contendo 30 mL de células sedimentadas foram adicionados a 150 mL de meio GN6 fresco (3,99 gm/L de Sais basais de Chu N6 com vitaminas (*PHYTOTECNOLOGIES LABORATORIES*, Cat # C167); 30 gm/L de Sacarose; 100 mg/L de Mio-Inositol; 2 mg/L de ácido 2,4-diclorofenóxi acético; no pH 6,0) em um frasco de 1 L estéril, e a cultura foi incubada em um agitador giro-rotativo como descrito acima.

[00298] A seguir de 18 a 24 h de incubação em meios GN6, a suspensão celular inteira foi transferida para um tubo de centrífuga de fundo cônico descartável de 175 mL estéril, e as células foram deixadas sedimentar durante 1 a 3 min, produzindo um volume de célula de cerca de 40 mL. O meio consumido foi cuidadosamente decantado, e

o líquido residual foi removido por pipeta para produzir uma massa de célula úmida. As células foram recolocadas em suspensão em cerca de 180 mL de meio com alto teor osmótico (GN6-SM; meio GN6 suplementado com 45 gm/L de sorbitol e 45 gm/L de manitol) no tubo de centrífuga, e a cultura foi colocada em um agitador oscilatório de topo de bancada na temperatura ambiente (23°C a 25°C) durante cerca de 30 minutos, mas não mais do que 45 minutos. A seguir do tratamento osmótico de 30 minutos, as células foram deixadas sedimentar no tubo de centrífuga durante 3 a 5 minutos. Depois, o líquido foi cuidadosamente removido até abaixo da marca de 50 mL do tubo de centrífuga por intermédio de pipeta, tomando cuidado para não agitar as células.

[00299] Para a liberação do DNA plasmídico às células de cultura de suspensão do milho, 5 mL de uma suspensão a 5 % p/p de fibras descontínuas de carboneto de silício BIOGRADE™ SC-9 (ADVANCED COMPOSITE MATERIALS, Greer, SC; lot 981011-101) foram preparados adicionando-se uma quantidade apropriada de meio GN6-SM a fibras descontínuas esterilizadas (esterilizadas em autoclave), secas. Uma quantidade de DNA apropriada de pDAB109830 (Exemplo 4) foi adicionada ao tubo de centrífuga (tipicamente suspensão a 80 µg/50 mL de 40 mL de células), a tampa foi selada firmemente, e o tubo foi suavemente turbilhonado para misturar os conteúdos. O tubo de centrífuga foi fixado com segurança em um misturador de tinta comercial (RED DEVIL™ Modelo 5400; Minneapolis, MN) modificado para segurar com segurança o tubo, e agitado durante 10 a 20 segundos. Depois da diluição para reduzir a osmolaridade do meio com cerca de 150 mL de meio fresco (GN6-SM:GN6; 2:1 v/v) a um volume final de cerca de 200 mL, as células foram incubadas em um agitador oscilatório de topo de bancada na temperatura ambiente durante cerca de 1 hora.

[00300] As células transfectadas foram depois transferidas por pipe-

ta em alíquotas de cerca de 8,3 mL sobre papel de filtro #4 de 70 mm estéril WHATMAN™ (THERMO FISHER SCIENTIFIC), tomando cuidado para distribuir uniformemente as células sobre o papel de filtro. Os filtros foram colocados em meio ágar GN6 em placas plásticas de 100 x 20 mm, e depois incubados em caixas plásticas na escuridão a 28°C durante 7 dias.

[00301] Uma semana depois da transformação, os papéis de filtro retendo as células foram transferidos para placas frescas de meio ágar sólido GN6-1H (meio GN6 suplementado com 2,5 gm/L de GELZAN™) contendo 1,0 mg/L de BIALAPHOS em placas de 100 x 20 mm, e incubados na escuridão a 28° C. BIALAPHOS foi fornecido como HERBIACE® (20 % ai) (MEIJI SEIKA KAISHA LTD.; Tokyo, JP).

[00302] Uma semana mais tarde, as células foram embutidas em ágar mole raspando-se os conteúdos celulares de cada papel de filtro em um tubo de centrífuga descartável estéril de 50 mL contendo 15 mL de meio de agarose mole GN6 (meio GN6 com 7,0 gm/L DE SEA-PLAQUE™ Agarose; LONZA, Rockland, ME) a 37° C a 40° C, agitando o tubo tampado vigorosamente, e depois vertendo os conteúdos do tubo uniformemente sobre quatro placas plásticas de 100 x 25 mm contendo meio ágar sólido GN61H. Cada placa foi agitada para revestir a superfície com uma camada uniforme da suspensão celular, e na solidificação as placas foram incubadas a 28° C na escuridão.

[00303] A seguir de seis a 10 semanas de incubação, colônias emergentes de crescimento favorável foram transferidas para placas frescas contendo meio ágar GN61H. Estas colônias transformadas candidatas foram deixadas cultivar durante 2 a 4 semanas no meio de seleção para estabelecer eventos estáveis tendo uma massa de cerca de 50 a 200 mg de tecido, que foram depois submetidos à análise molecular.

[00304] Amostras de 0,1 mL de células de calo empacotadas de

eventos candidatos foram testadas e colocadas em tubos de agrupamento de polipropileno de 1,2 mL COSTAR™ (CORNING, INC.; Corning NY) e congeladas a -80°C.

[00305] Análises moleculares: Eventos de célula do calo foram analisados quanto à expressão relativa o transcrito de tamanho natural por PCR quantitativa em tempo real do 3'UTR de Per 5, e o número de cópia foi estimado por comparação a um gene do milho interno (proteína semelhante a TIP41). O RNA foi isolado usando o kit RNeasy™ 96 (QIAGEN, Valencia, CA). Depois da primeira lavagem (RW1), as colunas foram tratadas com DNase isenta de RNase QIAGEN em tampão "RDD" (de acordo com o protocolo alternativo sugerido pelo kit). cDNA da primeira fita foi preparado usando um HIGH CAPACITY cDNA SYNTHESIS KIT (INVITROGEN) em um volume de reação de 10 µL com 5 µL de RNA desnaturado, substancialmente de acordo com o protocolo recomendado do fabricante. O protocolo foi modificado levemente para incluir a adição de 10 µL de oligonucleotídeo de T20VN a 100 µM (IDT) no tubo de 1 mL de mistura de estoque de iniciador aleatório, de modo a preparar um estoque de trabalho de iniciadores aleatórios e oligo dT combinados.

[00306] A seguir da síntese de cDNA, as amostras foram diluídas 1:3 com água isenta de nuclease, e armazenadas a -20° C até que fossem avaliadas. PCR em tempo real foi realizada em um LIGHTCYCLER™ 480 (ROCHE DIAGNOSTICS, Indianapolis, EM) em volume de reação de 10 µL. Todos os ensaios incluíram controles negativos de nenhum padrão (mistura apenas). Para as curvas padrão, um branco (água no reservatório de fonte) também foi incluído na placa de fonte para verificar quanto à contaminação cruzada da amostra. As reações foram conduzidas com a ROCHE UNIVERSAL PROBE™ em 0,5 µM e os iniciadores para os genes alvos e de referência em 10 µM. As sequências de iniciador são apresentadas na Tabela 16. Con-

dições de reações de PCR foram como segue: (1) Ativação alvo a 95° C durante 10 min; (2) 43 ciclos de (desnaturação a 95° C durante 10 s e extensão a 60° C); (3) aquisição a 72° C durante 1 s; e (4) resfriamento a 40° C durante 10 s.

Tabela 16. Sequências de iniciador usadas para análises moleculares de milho transgênico.

Iniciador	Alvo	SEQ ID Nº	Sequência do Iniciador
MZTIPU67F	TIP41*	SEQ ID NO: 132	AGCCAAGCCAGTGGTACTTC
MZTIPU67R	TIP41	SEQ ID NO: 133	TCGCAGACAAAAGTAGCAAATGT
P5U76S (F)	Per5 3'UTR	SEQ ID NO: 134	TTGTGATGTTGGTGGCGTAT
P5U76A (R)	Per5 3'UTR	SEQ ID NO: 135	TGTTAAATAAAACCCCAAAGATCG

*proteína semelhante a TIP41; homólogo do milho de AT4G34270 por tBLASTx (74 % de identidade)

[00307] Análise dos dados: Os dados foram analisados usando o Software LIGHTCYCLER™ v1.5 por quantificação relativa usando um algoritmo máximo de derivado secundário para o cálculo de valores de Cq de acordo com as recomendações do fornecedor. Para análises de expressão, valores de expressão foram calculados usando o método de ΔC_t (isto é, $2^{-(C_q \text{ ALVO} - C_q \text{ REF})}$), que depende da comparação de diferenças de valores de Cq entre dois alvos, com o valor de base de 2 sendo selecionado sob a suposição de que, para reações de PCR otimizadas, o produto duplica a cada ciclo.

[00308] Regeneração da planta transgênica: Alguns eventos estavelmente transformados foram regenerados em plantas para bioensaios de insetos dentro da planta.

[00309] A seguir do processo de seleção, culturas de calo foram transferidas para o Meio de Pré-Regeneração 28 (4,33 gm/L de Meio Basal de MS com Vitaminas; 30,0 gm/L de Sacarose; 5 mg/L de 6-Benzilaminopurina; 25 µg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético; 2,5 gm/L de GELZAN™; e 1,0 mg/L DE BIALAPHOS). Culturas de calo transferidas foram incubadas durante 7 dias a 28°C sob luz fluorescente branca

contínua (aproximadamente $50 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

[00310] Para a regeneração, as culturas foram transferidas para o Meio de Regeneração 36 (4,33 gm/L de Meio Basal de MS com Vitaminas; 30 gm/L de Sacarose; 2,5 gm/L de GELZAN™; e 1,0 mg/L DE BIALAPHOS), e plântulas foram deixadas gerar e crescer a 28°C sob luz fluorescente branca contínua durante até 3 semanas. Quando plântulas atingiram um estágio de crescimento adequado, elas foram excisadas com um fórceps e escalpelo, transferidas para um tubo de teste de 20 x 100 mm contendo ágar, e colocadas na luz durante 2 dias.

[00311] Plantas transgênicas foram designadas identificadores únicos, e transferidas para uma câmara de ambiente controlado (~28°C de temperatura diurna; 24°C de temperatura noturna; com um fotoperíodo de iluminação suplementar de 16:8). Plantas transgênicas foram transplantadas dos tubos aos vasos de 3,5 polegadas (8,9 cm), e devolvidas para a câmara de ambiente controlado durante 1 a 2 semanas para ajudar a aclimatizar as plantas. Plantas transgênicas foram depois movidas para a estufa, e transplantadas dos vasos pequenos para ROOTRAINERS™ (estilo TINUS™ 350-4; SPENCER-LEMAIRE INDUSTRIES; Acheson, Alberta, Canada), em uma planta por evento por ROOTRAINER™, para bioensaios de alimentação de insetos. Aproximadamente quatro dias depois do transplante para ROOTRAINERS™, as plantas T₀ foram preparadas para o bioensaio de alimentação de insetos. Bioensaios de alimentação de insetos foram conduzidos pelos métodos descritos no Exemplo 12.

[00312] A presença e expressão de um transgene produzindo dsRNA do tipo grampo de cabelo resultam em uma redução na poda da raiz de WCR, como foi evidente naquelas plantas que exibem níveis de expressão altos do transcrito de dsRNA (como medido por contagem de PCR relativa do 3'UTR de Per5). Os resultados dos bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental naqueles eventos contendo um

grupo de cabelo de RNAi compreendendo a SEQ ID NO: 97, e que têm um nível de expressão relativa 16 vezes mais alto do que o gene de referência semelhante a TIP41 interno, são mostrados na Tabela 17. Os resultados indicam o resultado surpreendente de que 36% das plantas de RNAi transgênicas demonstraram dano a WCR reduzido, quando comparado a apenas 3% das plantas de controle não transgênicas testadas. Embora a resposta biológica seja variável dentro das plantas transgênicas de milho T₀, as plantas transgênicas mostraram redução apreciável de poda de WCR quando comparado às plantas de controle não transgênicas.

Tabela 17. Resultados de bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental de eventos de milho transgênico Hi-II expressando um dsRNA do tipo grampo de cabelo de Caf1-180.

Evento	Nº de Plantas com Classificação de raiz ≤ 0,75	Nº Total de Plantas por Evento	% de Plantas com Classificação de raiz ≤ 0,75
109830[2]-001	4	9	44
109830[2]-002	1	4	25
109830[2]-004	4	7	57
109830[2]-025	0	7	0
109830[4]-005	3	6	50
Transgênicos totais	12	33	36
Plantas de controle Hi-II	1	30	3

Exemplo 10: Produção mediada por WHISKERS de tecidos de milho transgênico compreendendo dsRNAs do tipo grampo de cabelo v3 de VatpaseC e v4 de VatpaseC inseticidas

[00313] Os métodos de transformação descritos no Exemplo 9 foram usados para fornecer plantas transgênicas de milho Hill expressando dsRNA do tipo grampo de cabelo v3 de VatpaseC ou dsRNA do tipo grampo de cabelo v4 de VatpaseC, por transformação com plasmídeos pDAB109828 e pDAB109838 (Exemplo 4). Triagem molecular

foi realizada de acordo com os métodos de triagem descritos no Exemplo 9, e bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental foram realizados de acordo com os métodos de bioensaio descritos no Exemplo 12.

[00314] A presença e expressão de um transgene produzindo grampo de cabelo dsRNA resulta em uma redução na poda da raiz de WCR, como foi evidente naquelas plantas que exibem níveis de expressão altos do transcrito de dsRNA (como medido por contagem de PCR relativa do 3'UTR de Per5). Os resultados dos bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental sobre aqueles eventos contendo um grampo de cabelo de RNAi compreendendo a SEQ ID NO: 100 (v3 de VatpaseC) ou SEQ ID NO: 103 (v4 de VatpaseC), e que têm um nível de expressão relativa 20 vezes mais alto do que o gene de referência semelhante a TIP41 interno, são mostrados na **Tabela 18**. Os resultados indicam o resultado surpreendente de que 43 % de plantas de RNAi transgênicas demonstraram dano a WCR reduzido, quando comparado a 0 % das plantas de controle não transgênicas testadas. Embora a resposta biológica seja variável dentro das plantas transgênicas de milho T₀, apenas as plantas transgênicas mostraram redução apreciável da poda de WCR.

Tabela 18. Resultados dos bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental de eventos de milho transgênico Hi-II expressando um dsRNA do tipo grampo de cabelo v3 ou v4 de VatpaseC.

Evento	Nº de Plantas com Classificação de raiz ≤ 0,5	Nº Total de Plantas por Evento	% de Plantas com Classificação de raiz ≤ 0,5
109828[4]-011	5	10	50
109828[4]-016	1	5	20
109828[4]-006	2	6	33
109838[3]-003	2	2	100

109838[3]-002	5	10	50
109838[3]-001	2	2	100
109838[4]-020	1	5	20
109838[3]-006	0	2	0
Transgênicos totais	18	42	43
Plantas de controle Hi-II	0	26	0

Exemplo 11: Produção mediada por WHISKERS de tecidos de milho transgênico compreendendo dsRNAs do tipo grampo de cabelo v1 de VatpaseH inseticidas

[00315] Os métodos de transformação descritos no Exemplo 9 foram usados para fornecer plantas transgênicas do milho Hill expressando dsRNA do tipo grampo de cabelo v1 de VatpaseH, por transformação com plasmídeo pDAB109829 (Exemplo 4). A triagem molecular foi realizada de acordo com os métodos de triagem descritos no Exemplo 9, e bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental foram realizados de acordo com os métodos de bioensaio descritos no Exemplo 12.

[00316] A presença e expressão de um transgene produzindo grampo de cabelo dsRNA resultam em uma redução na poda da raiz de WCR, como foi evidente naquelas plantas que exibem níveis de expressão altos do transcrito de dsRNA (como medido por contagem de PCR relativa do 3'UTR de Per5). Os resultados de bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental sobre aqueles eventos contendo um grampo de cabelo de RNAi compreendendo a SEQ ID NO: 106, e que têm um nível de expressão relativa 18 vezes mais alto do que o gene de referência semelhante a TIP41 interno, são mostrados na **Tabela 19**. Os resultados indicam o resultado surpreendente de que 60 % das plantas de RNAi transgênicas demonstraram dano a WCR reduzido, quando comparado a 0 % das plantas de controle não transgênicas testadas. Embora a resposta biológica seja variável dentro das plantas

transgênicas de milho T₀, apenas as plantas transgênicas mostraram redução apreciável da poda de WCR.

Tabela 19. Resultados de bioensaios de crisomelídeo do milho ocidental de um evento de milho transgênico Hi-II expressando um dsRNA do tipo grampo de cabelo de VatpaseH.

Evento	Nº de Plantas com Classificação de raiz $\leq 0,5$	Nº Total de Plantas por Evento	% de Plantas com Classificação de raiz $\leq 0,5$
109829[1]-005	3	5	60 %
Plantas de controle Hi-II	0	30	0 %

Exemplo 12: Bioensaio de insetos do milho transgênico

[00317] Ovos de crisomelídeo do milho ocidental (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) foram recebidos no solo da Crop Characteristics (Farmington, MN). Os ovos foram incubados a 28°C durante 10 a 11 dias. Os ovos foram lavados do solo, colocados em uma solução de ágar a 0,15 %, e a concentração foi ajustada para aproximadamente 75 a 100 ovos por alíquota de 0,25 mL. Uma placa de incubação foi preparada em uma placa de Petri com uma alíquota de suspensão de ovo para monitorar as taxas de incubação.

[00318] O solo em torno das plantas de milho foi infestado com 150 a 200 ovos de WCR. Os insetos foram deixados alimentar durante 2 semanas, depois do tempo este que uma "Classificação de raiz" foi dada a cada planta. Uma escala de Nó-Dano foi utilizada para a classificação. Oleson *et al.* (2005) J. Econ. Entomol. 98(1):1-8.

[00319] Plantas com uma classificação de raiz de 0,75 ou melhor foram transplantadas imediatamente para vasos de 5 galões (19 L) para a produção de sementes. Os transplantes foram tratados com inseticida para impedir dano ao crisomelídeo adicional e liberação de insetos nas estufas. Plantas Hill foram cruzadas à linhagem de milho pura 5XH751 (doadora de pólen) para a produção de sementes. Se-

mentes produzidas por estas plantas são preservadas para avaliação nas gerações T₁ e subsequentes de plantas.

[00320] **Exemplo 13: *Zea mays* transgênica compreendendo sequências de praga de coleóptero**

[00321] Dez a 20 plantas de *Zea mays* T₀ transgênicas são geradas como descrito nos Exemplos 8 e 9. 10 a 20 linhagens independentes de *Zea mays* T₁ adicionais expressando dsRNA do tipo grampo de cabelo para uma construção de RNAi como apresentado nas SEQ ID NOs: 1 a 4 são obtidas para inoculação de crisomelídeo do milho. Estas são confirmadas através de RT-PCR. RNA Total de linhagens T₁ independentes selecionadas é opcionalmente usado para RT-PCR com iniciadores designados para ligar no íntron de *pdk* do cassete do tipo grampo de cabelo em cada uma das construções de RNAi. Além disso, iniciadores específicos para cada gene alvo em uma construção de RNAi são opcionalmente usados para ampliar e confirmar a produção do mRNA pré-processado necessário para a produção de siRNA dentro da planta. A ampliação das faixas desejadas para cada gene alvo confirma a expressão do RNA do tipo grampo de cabelo em cada *Zea mays* transgênica. O processamento do grampo de cabelo de dsRNA dos genes alvos em siRNA é subsequentemente opcionalmente confirmado em linhagens transgênicas independentes usando hibridizações de mancha de RNA.

[00322] Comparação fenotípica de linhagens de RNAi transgênicas e *Zea mays* do tipo selvagem.

[00323] Genes ou sequências de praga de coleóptero alvos selecionados para criar dsRNA do tipo grampo de cabelo não têm nenhuma similaridade a qualquer gene ou sequência de planta conhecidos. Consequentemente não é esperado que a produção ou a ativação de RNAi (sistêmico) por construções alvejando estes genes ou sequências tenha qualquer efeito deletério sobre plantas transgênicas. Entre-

tanto, as características de desenvolvimento e morfológicas de linhagens transgênicas são comparadas com plantas do tipo selvagem, assim como aquelas de linhagens transgênicas transformadas com um vetor do tipo grampo de cabelo vazio. As características da raiz, broto, folhagem e reprodução da planta são comparadas. Não há nenhuma diferença observável nos padrões de comprimento e crescimento da raiz de plantas transgênicas e do tipo selvagem. Características do broto da planta tais como altura, números e tamanhos das folhas, tempo de florescência, tamanho e aparência florais são similares. Em geral, não existe nenhuma diferença morfológica observável entre as linhagens transgênicas e aquelas sem expressão de moléculas de iRNA alvos quando cultivadas *in vitro* e no solo na estufa para plantas.

[00324] **Exemplo 14: *Zea mays* transgênica compreendendo uma sequência de praga de coleóptero e construções de RNAi adicionais**

[00325] Uma planta de *Zea mays* transgênica compreendendo uma sequência de codificação heteróloga em seu genoma que é transcrita em uma molécula de iRNA que alveja um organismo exceto uma praga de coleóptero é transformada por intermédio de transformação mediada por *Agrobacterium* ou WHISKERS™ para produzir uma ou mais moléculas de dsRNA inseticidas (por exemplo, pelo menos uma molécula de dsRNA incluindo uma molécula de dsRNA alvejando um gene compreendendo uma das SEQ ID NOs: 1 a 4). Preparações de moléculas de DNA de transformação de planta preparadas essencialmente como descrito no Exemplo 4 são liberadas em culturas de célula em suspensão de milho Hi-II obtidas de uma planta de *Zea mays* transgênica compreendendo uma sequência de codificação heteróloga em seu genoma que é transcrita em uma molécula de iRNA que alveja um organismo exceto uma praga de coleóptero.

[00326] **Exemplo 15: Plantas resistentes à praga de coleóptero**

transgênicas

[00327] A liberação dentro da planta de dsRNA, siRNA ou miRNA correspondendo a genes alvos e a absorção subsequente por pragas de coleópteros através da alimentação resultam na infrarregulação dos genes alvos através do silenciamento de gene mediado por RNA. Quando a função de um gene alvo é importante, o crescimento, desenvolvimento, e reprodução da praga de coleóptero são afetados, e no caso de pelo menos um de WCR, NCR, SCR, MCR, *D. balteata* LeConte, *D. u. tenella*, e *D. u. undecimpunctata* Mannerheim levam a falha para prosperamente parasitar, alimentar, desenvolver, e/ou reproduzir, ou levam a morte da praga de coleóptero em um ou mais estágios de desenvolvimento. A escolha dos genes alvos e a aplicação bem sucedida de RNAi depois são usadas para controlar pragas de coleópteros. Cinco a dez repetições de 10 a 20 linhagens transgênicas de *Z. mays* T₁ independentes para cada construção de RNAi são inoculadas com uma espécie de crisomelídeo do milho. A inoculação é duplicada para cada espécie de crisomelídeo do milho. Sementes T₁ de linhagens de RNAi são germinadas, e plantas resistentes transferidas ao meio de Knop modificado 10 a 15 dias depois da germinação. Sementes de *Z. mays* de controle do tipo selvagem são germinadas ao mesmo tempo, e usadas para infecção do crisomelídeo do milho.

[00328] Existem significativamente mais de (> 50 %) crisomelídeos do milho sobreviventes em controles do que em linhagens de *Z. mays* transgênicas que abrigam uma ou mais construções de RNAi. A abundância de iRNA é medida em crisomelídeos do milho que alimentam-se das raízes de plantas do tipo selvagem e transgênicas usando RT-PCR quantitativa em tempo real. Existem significativamente mais moléculas de iRNA encontradas em linhagens de *Z. mays* transgênicas que abrigam uma ou mais construções de RNAi do que em plantas de controle. Estes resultados indicam que linhagens transgênicas proces-

sam siRNAs correspondendo a genes alvos e que estes siRNAs estão disponíveis para absorção por crisomélídeos do milho que se alimentam. Mais importante, os resultados indicam que a inibição mediada por RNAi de todos os genes alvos afeta o crescimento, desenvolvimento, e viabilidade do crisomélídeo do milho alvo. Além disso, moléculas de RNAi com sequências de disparidade com mais do que 80 % de identidade de sequência aos genes alvos afetam crisomélídeos do milho em uma maneira similar às sequências do tipo selvagem. O pareamento de sequência mal combinada com sequências nativas para formar um dsRNA do tipo grampo de cabelo na mesma construção de RNAi libera siRNAs processados na planta capazes de afetar o crescimento, desenvolvimento e viabilidade das pragas de coleópteros que se alimentam.

FIG. 5.

5'-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-3'

5'-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-(SEQ ID NO:1, 3, or 4)-(*sequence*)-3'

5'-(*sequence*)-(SEQ ID NO:1, 3, or 4)-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-3'

5'-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-3'

5'-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-(fragment of one of SEQ ID NO:1, 3, or 4)-(*sequence*)-3'

5'-(*sequence*)-(fragment of one of SEQ ID NO:1, 3, or 4)-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-3'

5'-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-(fragment of one of SEQ ID NO:1, 3, or 4)-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-3'

5'-(*sequence*)-(fragment of one of SEQ ID NO:1, 3, or 4)-(*sequence*)-(SEQ ID NO:9, 10, or 11)-(*sequence*)-(fragment of one of SEQ ID NO:1, 3, or 4)-(*sequence*)-3'

Additional elements such as those contained in brackets “()” may be added to the 5' and 3' end of the nucleic acid molecule as desired.

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 9; o complemento da SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; o complemento da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; o complemento da SEQ ID NO: 11; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; uma sequência de codificação nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; o complemento de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência que não de codificação nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9.
2. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: toda ou parte da SEQ ID NO: 1;

todo ou parte do complemento da SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; o complemento da SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; o complemento da SEQ ID NO: 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 1, 2, ou 4.

3. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que atente a pelo menos uma das características abaixo

- a pelo menos uma sequência de nucleotídeo é operavelmente ligada a um promotor heterólogo;
- o polinucleotídeo é selecionado do grupo consistindo nas SEQ ID NOs: 104 a 106;
- o polinucleotídeo é pelo menos cerca de 50 nucleotídeos em

comprimento, preferencialmente pelo menos cerca de 100 nucleotídeos em comprimento, mais preferencialmente o polinucleotídeo é cerca de 100 nucleotídeos em comprimento.

5 4. Vetor de transformação de planta, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 1.

5 5. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o organismo *Diabrotica* é selecionado do grupo consistindo em *D. v. virgifera* LeConte; *D. barberi* Smith e Lawrence; *D. u. howardi*; *D. v. zaeae*; *D. balteata* LeConte; *D. u. tenella*; e *D. u. undecimpunctata* Mannerheim.
10

6. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo é uma molécula de ácido ribonucleico (RNA), preferencialmente selecionada do grupo consistindo em uma molécula de ácido ribonucleico de fita dupla e uma molécula de ácido ribonucleico de fita simples de entre cerca de 50 e cerca de 300 nucleotídeos de comprimento ou uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), em que o ácido desoxirribonucleico preferencialmente compreende SEQ ID NO: 136.
15

7. Molécula de ácido ribonucleico de fita dupla, caracterizada pelo fato de que é produzida a partir da expressão do ácido desoxirribonucleico como definido na reivindicação 6.
20

8. Molécula de ácido ribonucleico de fita dupla de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o contato da sequência de polinucleotídeo com a praga de coleóptero inibe a expressão de uma sequência de nucleotídeo endógena especificamente complementar à sequência de polinucleotídeo como definido na reivindicação 1 ou mata ou inibe o crescimento, reprodução, e/ou alimentação da praga de coleóptero.
25

9. Molécula de ácido ribonucleico de fita dupla de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que compreende uma primeira, uma segunda e uma terceira sequência de polinucleotídeo, em que a primeira sequência de polinucleotídeo compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 1, em que a terceira sequência de polinucleotídeo é ligada à primeira sequência de polinucleotídeo pela segunda sequência de poli-
30

nucleotídeo, e em que a terceira sequência de polinucleotídeo é substancialmente o complemento reverso da primeira sequência de polinucleotídeo, tal que as primeira e terceira sequências de polinucleotídeo hibridizam quando transcritas em um ácido ribonucleico para formar a molécula de ribonucleotídeo de fita dupla.

10. Molécula de ácido ribonucleico de fita dupla de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a segunda sequência de polinucleotídeo compreende a SEQ ID NO: 136.

11. Molécula de ácido ribonucleico, caracterizada pelo fato de que é produzida a partir da expressão do ácido desoxirribonucleico como definido na reivindicação 6, em que a molécula de ácido ribonucleico é selecionada do grupo consistindo em uma molécula de ácido ribonucleico de fita dupla e uma molécula de ácido ribonucleico de fita única de entre cerca de 50 e cerca de 300 nucleotídeos em comprimento.

12. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende mais do que uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 9; o complemento da SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; o complemento da SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; o complemento da SEQ ID NO: 11; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; uma sequência de codificação nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; o complemento de uma sequência de codificação nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; o complemento de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo qualquer uma das SEQ ID NOs: 3 e/ou 9 a 11; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma se-

quência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; um frag-
5 mento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não co-
dicante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molé-
cula de RNA nativa compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9; e o
complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de
uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é
10 transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo toda ou parte da
SEQ ID NO: 9.

13. Vetor de transformação de planta, caracterizado pelo fato de
que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 1 ou 12,
em que a pelo menos uma sequência de nucleotídeo é operavelmente ligada
15 a um promotor heterólogo funcional em uma célula de planta.

14. Célula, caracterizada pelo fato de que é transformada com o
polinucleotídeo como definido na reivindicação 1 ou 12, em que preferenci-
almente a célula é uma célula procariótica ou uma célula eucariótica.

15. Método para controlar uma população de praga de coleópte-
20 ro, caracterizado pelo fato de que compreende fornecer um agente compre-
endendo uma molécula de ácido ribonucleico de fita dupla que funciona em
contato com a praga de coleóptero para inibir uma função biológica dentro
da praga de coleóptero, em que o agente compreende uma sequência de
nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o comple-
25 mento da SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos con-
tíguos da SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19
nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; uma sequência codificante nativa
de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o comple-
mento de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica*
30 compreendendo a SEQ ID NO: 3; uma sequência não codificante nativa de
um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nati-
va compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência não

codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo de *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3.

16. Método para controlar uma população de praga de coleóptero, caracterizado pelo fato de que compreende fornecer um agente compreendendo uma primeira e uma segunda sequência de polinucleotídeo que funciona em contato com a praga de coleóptero para inibir uma função biológica dentro da praga de coleóptero, em que a primeira sequência de polinucleotídeo compreende uma região que exibe de cerca de 90% a cerca de 100% de identidade de sequência a cerca de 19 a cerca de 30 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3, e em que a primeira sequência de polinucleotídeo é especificamente hibridizada à segunda sequência de polinucleotídeo, em que preferencialmente a primeira sequência de polinucleotídeo compreende ainda uma região que exibe de cerca de 90% a cerca de 100% de identidade de sequência a cerca de 19 a cerca de 30 nucleotídeos contíguos de um gene de praga de coleóptero selecionado do grupo consistindo em: um gene de *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 1; a subunidade C de ATPase vacuolar; e a proteína pequena Rho1 de ligação a GTP.

17. Método para controlar uma população de praga de coleóptero, caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer em uma planta hospedeira de uma praga de coleóptero uma célula de planta transformada compreendendo um polinucleotídeo

compreendendo pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3, em que o polinucleotídeo é expressado para produzir uma molécula de ácido ribonucleico que funciona em contato com uma praga de coleóptero que pertence à população para inibir a expressão de uma sequência alvo dentro da praga de coleóptero e resulta em crescimento diminuído da praga de coleóptero ou população de praga de coleóptero, em relação ao crescimento em uma planta hospedeira da mesma espécie que carece da célula de planta transformada, em que preferencialmente a molécula de ácido ribonucleico é uma molécula de ácido ribonucleico de fita dupla.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a população de praga de coleóptero é reduzida em relação a

uma população de praga de coleóptero que infesta uma planta hospedeira da mesma espécie que carece da célula de planta transformada.

5 19. Método de controlar a infestação por praga de coleóptero de planta em uma planta, caracterizado pelo fato de que compreende fornecer na dieta de uma praga de coleóptero um polinucleotídeo compreendendo pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; uma 10 sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de 15 uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos con- 20 tíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nu- 25 cleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3, em que preferencialmente a dieta compreende uma célula de planta transformada para expressar o polinucleotídeo.

30 20. Método para melhorar o rendimento de uma safra de milho, caracterizado pelo fato de que compreende:

introduzir em uma planta do milho para produzir uma planta transgênica do milho um polinucleotídeo compreendendo pelo menos uma

sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; e

cultivar a planta do milho para permitir a expressão de a pelo menos uma sequência de nucleotídeo; em que a expressão de a pelo menos uma sequência de nucleotídeo inibe a infecção ou crescimento da praga de coleóptero e perda de rendimento devido à infecção por praga de coleóptero, em que preferencialmente a expressão de a pelo menos uma sequência de nucleotídeo produz uma molécula de RNA que suprime pelo menos um primeiro gene alvo em uma praga de coleóptero que contactou uma porção da planta do milho.

21. Método para produzir uma célula de planta transgênica, caracterizado pelo fato de que compreende:

transformar uma célula de planta com um vetor compreendendo um polinucleotídeo operativamente ligado a um promotor e uma sequência de terminação de transcrição, em que o polinucleotídeo compreende pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionada do grupo consistindo em:

5 SEQ ID NO: 3; o complemento da SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 3; uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência codificante nativa de um

10 organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3;

15 um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência codificante nativa de um organismo *Diabrotica* compreendendo a SEQ ID NO: 3; um fragmento de pelo menos 19 nucleotí-

20 deos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compreendendo a SEQ ID NO: 3; e o complemento de um fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência não codificante nativa de um organismo *Diabrotica* que é transcrita em uma molécula de RNA nativa compre-

25 endendo a SEQ ID NO: 3;

cultivar a célula de planta transformada sob condições suficientes para permitir o desenvolvimento de uma cultura de células de planta compreendendo uma pluralidade de células de plantas transformadas;

30 selecionar as células de plantas transformadas que têm integrada a pelo menos uma sequência de nucleotídeo em seus genomas;

triar as células de plantas transformadas quanto à expressão de uma molécula de ácido ribonucleico codificado por a pelo menos uma se-

quência de nucleotídeo; e

selecionar uma célula de planta que expressa o dsRNA.

22. Método para produzir uma planta transgênica resistente à praga de coleóptero, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 fornecer a célula de planta transgênica produzida pelo método como definido na reivindicação 21; e

 regenerar uma planta transgênica a partir da célula de planta transgênica, em que a expressão da molécula de ácido ribonucleico codificado pela pelo menos uma sequência de nucleotídeo é suficiente para modular a expressão de um gene alvo em uma praga de coleóptero que contata a planta transformada.

10

 23. Ácido nucleico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um polinucleotídeo que é substancialmente homólogo a um polinucleotídeo de referência selecionado do grupo consistindo em: SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; e um fragmento compreendendo toda ou parte da SEQ ID NO: 9 tendo pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de um gene de *Diabrotica*, em que o polinucleotídeo é preferencialmente pelo menos 80% idêntico ao polinucleotídeo de referência, mais preferencialmente pelo menos 90% idêntico ao polinucleotídeo de referência, e particularmente preferivelmente pelo menos 95 % idêntico ao polinucleotídeo de referência.

15

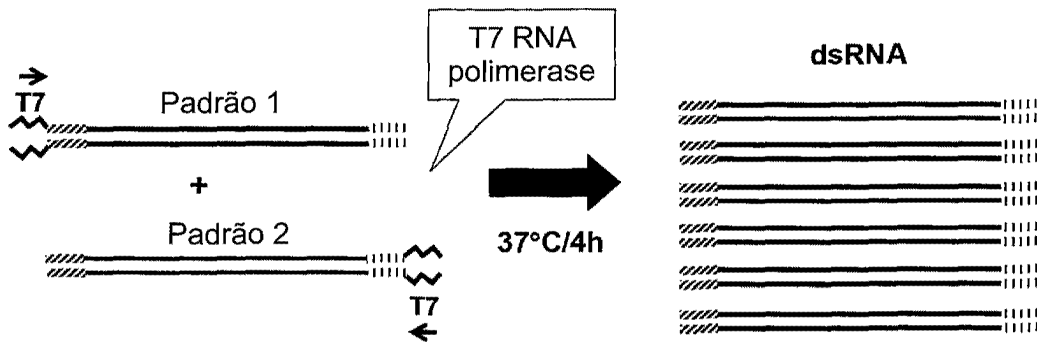
20

 24. Ácido nucleico isolado de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que a SEQ ID NO: 3 hibridiza ao pelo menos um polinucleotídeo sob condições de severidade moderada, preferencialmente sob condições de severidade alta.

25

 25. Invenção, caracterizada por quaisquer de suas concretizações ou categorias de reivindicação englobadas pela matéria inicialmente revelada no pedido de patente ou em seus exemplos aqui apresentados.

FIG. 1.



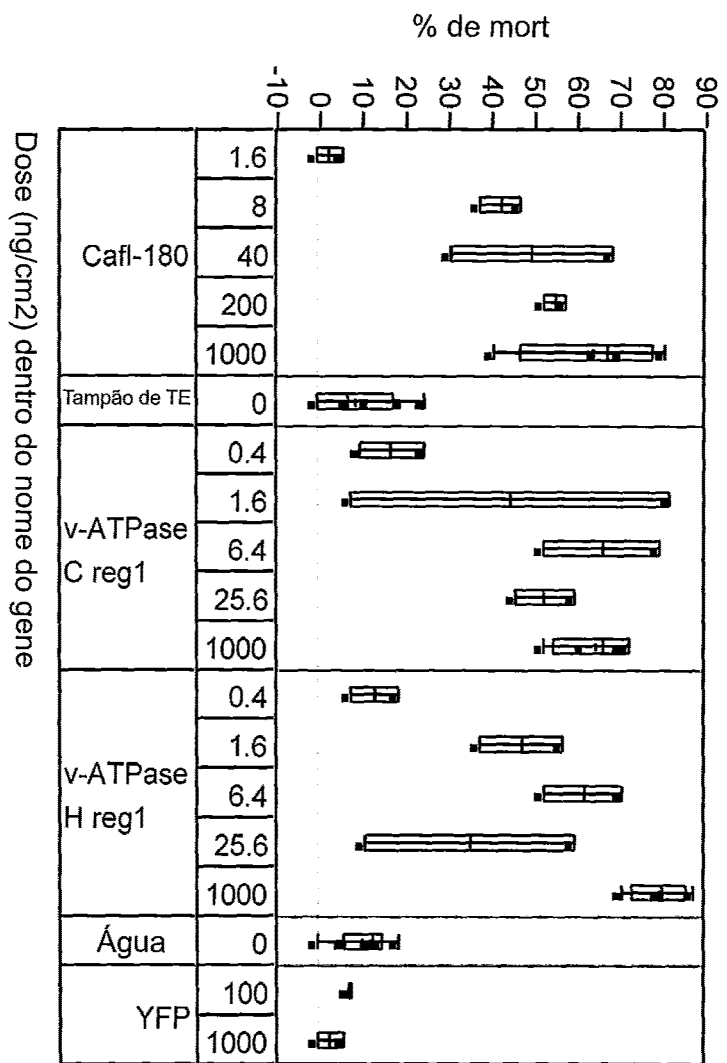


FIG. 2.

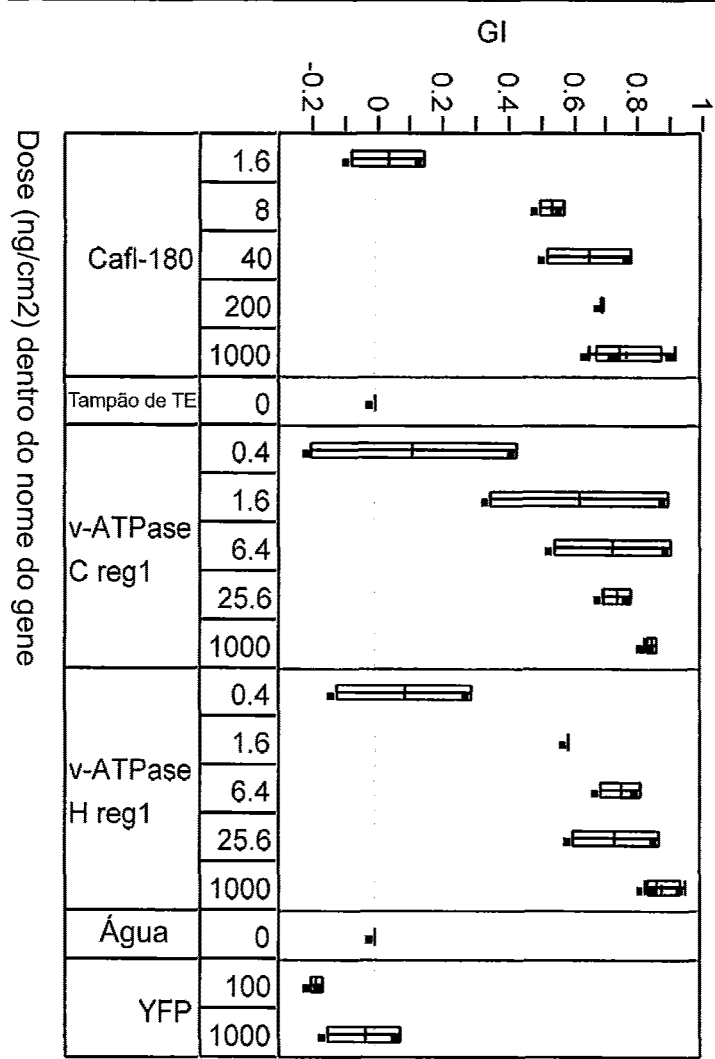
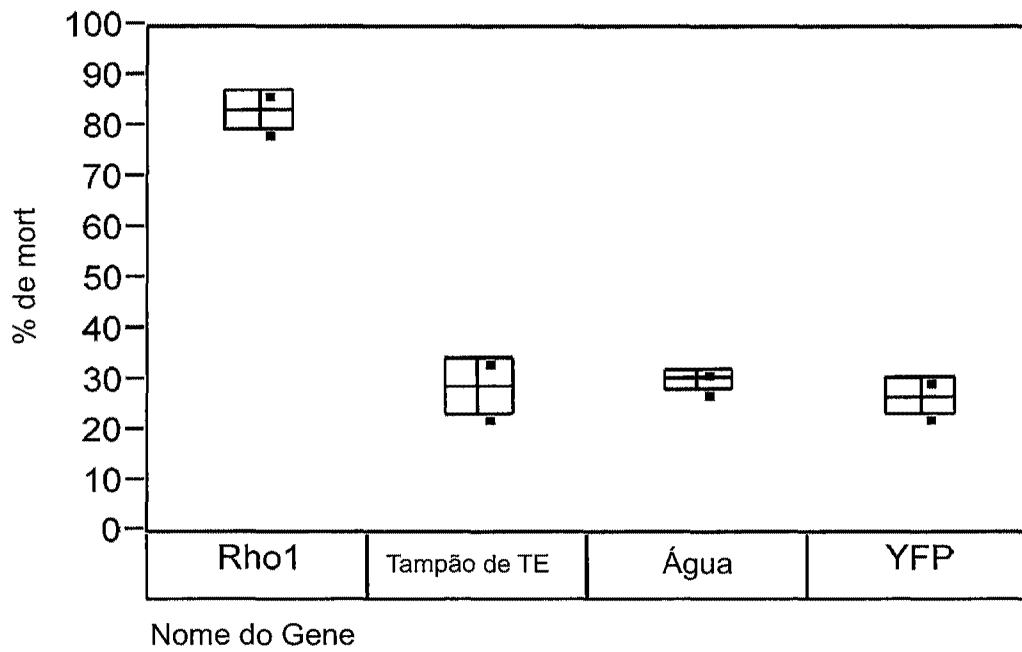


FIG. 3.

FIG. 4.



RESUMO

Patente de Invenção: **"MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLÉICO QUE DIRECIONADAS À SUBUNIDADE H DE ATPASE VACUOLAR QUE CONFEREM RESISTÊNCIA A PRAGAS DE COLEÓPTEROS, VETOR DE TRANSFORMAÇÃO DE PLANTA, CÉLULA TRANSFORMADA, BEM COMO MÉTODOS PARA CONTROLAR UMA POPULAÇÃO DE PRAGA DE COLEÓPTERO, CONTROLAR UMA INFESTAÇÃO PELA DITA PRAGA, MELHORAR O RENDIMENTO DE UMA SAFRA E PARA PRODUZIR UMA CÉLULA TRANSGÊNICA".**

10 A invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico e métodos de uso destas para o controle de pragas de coleópteros através de inibição mediada por interferência de RNA de sequências de codificação e que não de codificação transcritas alvos em pragas de coleópteros. A invenção também refere-se a métodos para fabricar plantas transgênicas que expressam

15 moléculas de ácido nucleico úteis para o controle de pragas de coleópteros, e as células de plantas e plantas obtidas deste modo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



B0D76B8098AF171A

Campo 2



E78DE5EB9FB9DD8C

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p182763 23337236_1.txt
- Data de Geração do Código: 17-12-2014
- Hora de Geração do Código: 10:19:17
- Código de Controle:
 - Campo 1: B0D76B8098AF171A
 - Campo 2: E78DE5EB9FB9DD8C