



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

(21) BR 112021000759-8 A2



(22) Data do Depósito: 17/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/04/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MITIGAR A INFESTAÇÃO DE PESTES

(51) Int. Cl.: A01N 63/02; A01H 5/00.

(30) Prioridade Unionista: 18/07/2018 US 62/699,853.

(71) Depositante(es): PLANTARCBIO LTD.; MERHAV AGRO LTD..

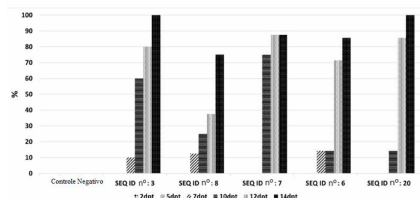
(72) Inventor(es): DROR SHALITIN; NOAM GRIMBERG; NIR MOGILNER.

(86) Pedido PCT: PCT IL2019050804 de 17/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/016892 de 23/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 15/01/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MITIGAR A INFESTAÇÃO DE PESTES. dsRNA para prevenir, mitigar e/ou tratar a infestação de uma planta com bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*), o dsRNA compreendendo uma sequência de polinucleotídeos que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras, em que a ingestão do polinucleotídeo do dsRNA pelo bicudo-vermelho-das-palmeiras resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento do mesmo.



“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MITIGAR A INFESTAÇÃO DE PRAGAS COM RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS”

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] Esta presente divulgação refere-se à inibição mediada por interferência de RNA de genes-alvo de pragas, particularmente bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*). A divulgação também se refere a plantas transgênicas que expressam moléculas de dsRNA úteis para o controle de pragas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] As pragas de insetos custam bilhões de dólares na forma de perdas de safra e inseticidas, e os agricultores enfrentam uma ameaça constante de resistência aos inseticidas, alimentando uma busca contínua por estratégias alternativas de controle de pragas.

[0003] O bicudo-vermelho-das-palmeiras *R. ferrugineus* é um besouro altamente invasivo que infesta as palmeiras. Os besouros adultos são relativamente grandes, variando entre dois e quatro centímetros de comprimento e geralmente têm uma cor vermelha enferrujada.

[0004] As larvas do bicudo escavam buracos no tronco de árvores de palmeiras até um metro de comprimento, dessa forma enfraquecendo e eventualmente matando a planta hospedeira. Como resultado, o bicudo é considerado uma praga importante nas plantações de palmeiras, incluindo coqueiros, tamareiras e dendezeiros.

[0005] É nativa do sul da Ásia e da Melanésia, mas desde os anos 80 expandiu rapidamente sua distribuição geográfica para o oeste. Chegou à Arábia Saudita e aos Emirados Árabes Unidos por volta de 1985, espalhando-se completamente pelo Oriente Médio e pelo Egito. Em 1994, o mesmo foi detectado na Espanha, e em 1999, em Israel, Jordânia e nos Territórios da Autoridade Palestina. Desde então, espalhou-se amplamente na região do Mediterrâneo, onde as duas principais espécies de palmeiras de interesse são a tamareira e a tamareira das Ilhas Canárias (*Phoenix canariensis*),

a principal espécies de cultura e ornamental. Ele também ataca várias outras palmeiras ornamentais que são regularmente importadas para a Grã-Bretanha, como a palmeira-moinho-de-vento (*Trachycarpus fortunei*). Ele devastou palmeiras ornamentais em muitas áreas do Mediterrâneo, mudando a paisagem, e a Comissão Europeia, conseqüentemente, introduziu medidas de emergência para evitar mais propagação da *R. ferrugineus*.

[0006] Progresso substancial foi feito nas últimas décadas no sentido de desenvolver métodos e composições eficientes para controlar infestações de insetos em plantas. Especialmente, os pesticidas químicos têm sido muito eficazes na erradicação de infestações de pragas. No entanto, existem várias desvantagens no uso de agentes pesticidas químicos. As aplicações de pesticidas químicos destinados ao controle de pragas também exercem seus efeitos sobre a fauna não alvo, frequentemente esterilizando efetivamente um campo por um período de tempo durante o qual os agentes pesticidas foram aplicados. Agentes pesticidas químicos persistem no meio ambiente e geralmente são metabolizados lentamente, se forem. Eles se acumulam na cadeia alimentar e os acúmulos desses agentes pesticidas químicos resultam no desenvolvimento de resistência aos agentes e podem frequentemente ser perigosos para os consumidores finais.

[0007] Assim, há uma necessidade há muito sentida de métodos favoráveis ao meio-ambiente para controlar ou erradicar a infestação de insetos nas plantas, ou seja, métodos que são seletivos, ambientalmente inertes, não persistentes e biodegradáveis e que se encaixam bem em esquemas de gestão de resistência a pragas.

[0008] Interferência de RNA (RNAi) é um processo que utiliza vias celulares endógenas, por meio do qual um RNA interferente (iRNA) também conhecido como molécula de RNA de interferência (RNAi) (por exemplo, uma molécula de dsRNA) que é específica para o todo, ou qualquer porção de tamanho adequado, de uma sequência de gene alvo, resulta na degradação do mRNA codificado desse modo.

[0009] Apenas os transcritos complementares ao pequeno RNA interferente (siRNA) e/ou microRNA (miRNA) são clivados e degradados e, portanto, o *knock-down* da expressão do mRNA é específico para a sequência.

[0010] No entanto, a eficiência do RNAi geralmente varia muito entre os diferentes insetos. Portanto, há uma necessidade de identificar sequências de nucleotídeos eficazes para uso na repressão, retardamento ou de outra forma redução da expressão gênica dentro de uma espécie de praga particular, tal como, mas não se limitando a, bicudo-vermelho-das-palmeiras, com o propósito de controlar a infestação.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0011] De acordo com algumas modalidades, a invenção fornece um método para inibir a expressão de um gene alvo em uma praga de coleópteros, tal como, mas não se limitando a, bicudo-vermelho-das-palmeiras. Em certas modalidades, o método compreende a modulação ou inibição da expressão de um ou mais genes-alvo na praga que causem a interrupção da alimentação, crescimento, desenvolvimento, reprodução, infecciosidade e/ou morte da praga. O método compreende a introdução de RNA de fita dupla (dsRNA), incluindo suas formas modificadas, como sequências de pequeno RNA interferente (siRNA), nas células ou no ambiente extracelular da praga, em que o dsRNA inibe a expressão de pelo menos um gene alvo e em que a inibição exerce um efeito deletério na praga. Os métodos e composições associadas podem ser usados para limitar ou eliminar a infestação de praga em ou sobre qualquer hospedeiro de praga, simbionte de praga ou ambiente em que uma praga está presente, fornecendo uma ou mais composições compreendendo as moléculas de dsRNA descritas neste documento para a praga, por exemplo, na dieta da praga ou na/sobre a planta da qual se alimenta. O método terá benefícios particulares para proteger as plantas do ataque de insetos.

[0012] De acordo com algumas modalidades, é fornecido um dsRNA para controlar, prevenir, mitigar e/ou tratar a infestação de uma planta com uma praga, o dsRNA compreendendo uma sequência polinucleotídica que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a pelo menos um fragmento de um gene alvo da praga, em que a ingestão do dito polinucleotídeo de dsRNA pela dita praga resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento da mesma. De acordo com algumas modalidades, é fornecido um dsRNA para controlar, prevenir, mitigar e/ou tratar a infestação de uma planta com uma praga que compreende a morte direcionada da praga, por exemplo, em seu estágio larval.

[0013] De acordo com algumas modalidades, a praga pode ser um bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*).

[0014] De acordo com algumas modalidades, a planta é uma palmeira da família *Arecaceae*. De acordo com algumas modalidades, a palmeira é selecionada a partir de *Phoenix dactylifera*.

[0015] De acordo com algumas modalidades, pelo menos um segmento do dsRNA é complementar a uma sequência de nucleotídeos (mRNA) dentro das células da praga. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA inibe a expressão de um gene e ou causa a degradação de um gene transcrito (mRNA) e/ou inibe o funcionamento do gene, em que o gene codifica pelo menos uma das sequências de mRNA estabelecidas nas SEQ ID nºs: 1 a 314 e 335 a 376.

[0016] É entendido por um versado na técnica que as sequências fornecidas na listagem de sequências podem incluir um 'u' representando uracila em vez de 't' representando timidina, quando em relação a uma molécula de RNA. De acordo com algumas modalidades, as sequências fornecidas na listagem de sequências podem ser sequências de codificação.

[0017] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 90% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-

palmeiras. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 95% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0018] De acordo com algumas modalidades, é fornecido um construto de DNA recombinante compreendendo um promotor heterólogo operacionalmente ligado a um dsRNA compreendendo uma sequência polinucleotídica que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a pelo menos um segmento de um gene alvo da praga, em que a ingestão do dito polinucleotídeo de dsRNA pela dita praga resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento da mesma.

[0019] De acordo com algumas modalidades, a praga pode ser um bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*).

[0020] De acordo com algumas modalidades, a planta é uma palmeira da família *Arecaceae*. De acordo com algumas modalidades, a palmeira é selecionada a partir de *Phoenix dactylifera*.

[0021] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 314 e 335 a 376.

[0022] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 26.

[0023] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 6.

[0024] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 26.

[0025] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 12, 14, 16 a 18,

20, 21, 24, 26, 335, 341 a 343, 346 a 348, 352 a 355, 359, 361, 362, 367 e 371 a 374.

[0026] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos de um gene relacionado/associado ao proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à proteína proteassomal tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 3, 6, 7, 8, 10, 19, 20, 21, 26, 30, 47, 55, 57, 63, 96, 121, 124, 125, 252, 272 e 235 a 376.

[0027] De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 3, 6, 7, 8, 10, 20, 21 e 26.

[0028] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade alfa proteassomal. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos do gene da subunidade alfa proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 7, 8, 47, 57, 63, 121, 124, 125, 252 e 272.

[0029] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade beta proteassomal. De acordo com algumas modalidades, o gene da subunidade beta proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 3, 10, 19, 20, 30, 55, 96 e 373 a 375.

[0030] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade RPN7 do proteassoma 26S. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica a subunidade RPN7 do proteassoma 26S tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 6, 21 e 26.

[0031] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a regulador de tamanho de substrato de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a regulador de tamanho de substrato de proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 335 e 336.

[0032] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade de corrente (*tether*) de proteassoma nuclear Cut8. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à corrente de proteassoma nuclear Cut8 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 337 a 340.

[0033] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a estabilizador de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a estabilizador de proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID nºs: 341 a 345.

[0034] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à protease de ubiquitina JAB1/Mov34/MPN/PAD-1. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à protease de ubiquitina JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 346 a 351.

[0035] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade beta pa28 de ativador de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade beta pa28 de ativador de proteassoma tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 352.

[0036] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à chaperona de

montagem de proteassoma 4. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 4 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 353.

[0037] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a membro da família PAC2. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a membro da família PAC2 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 354.

[0038] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 3. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 3 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 355 a 357.

[0039] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um regulador de proteassoma PI31. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a regulador de proteassoma PI31 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 358 a 360.

[0040] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado contendo domínio PITH associado ao proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a domínio PITH associado ao proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 361 a 366.

[0041] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 367 a 370.

[0042] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a receptor da ubiquitina Rpn13 da subunidade do complexo de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a receptor da ubiquitina Rpn13 da subunidade do complexo de proteassoma tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 371.

[0043] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é uma sequência de nucleotídeos que codifica um gene relacionado a domínio de ligação UCH do receptor-ubiquitina-proteassoma Rpn13. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a domínio de ligação UCH do receptor-ubiquitina-proteassoma Rpn13 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 373.

[0044] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 368 a 371.

[0045] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à proteína que interage com a proteína 1 de ligação Tat (TBP-1) (TBPIP). De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o gene relacionado a TBPIP tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 376.

[0046] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 90% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 95% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0047] De acordo com algumas modalidades, o promotor pode ter especificidade de tecido e pode, por exemplo, ser específico para um tipo de tecido que é sujeito ao ataque de pragas. No caso do bicudo-vermelho-das-palmeiras, por exemplo, pode ser desejável usar um promotor que proporcione expressão no tronco da planta e/ou xilema e/ou tecidos do floema.

[0048] De acordo com algumas modalidades, é fornecida uma célula hospedeira tendo incorporado em seu genoma uma sequência de nucleotídeos que, quando expressa, forma um dsRNA com uma sequência de polinucleotídeos que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo da praga, em que a ingestão do dito polinucleotídeo de dsRNA pela praga resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento da mesma.

[0049] De acordo com algumas modalidades, a praga pode ser um bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*).

[0050] De acordo com algumas modalidades, a planta é uma palmeira da família *Arecaceae*. De acordo com algumas modalidades, a palmeira é selecionada a partir de *Phoenix dactylifera*.

[0051] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 314 e 335 a 376.

[0052] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 26.

[0053] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 6.

[0054] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 12, 14, 16 a 18,

20, 21, 24, 26, 335, 341 a 343, 346 a 348, 352 a 355, 359, 361, 362, 367 e 371 a 374.

[0055] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a complexo proteassomal. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a complexo proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 3, 6, 7, 8, 10, 20, 21 e 26.

[0056] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade alfa proteassomal. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos do gene da subunidade alfa proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 7, 8, 47, 57, 63, 121, 124, 125, 252 e 272.

[0057] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade beta proteassomal. De acordo com algumas modalidades, o gene da subunidade beta proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 3, 10, 19, 20, 30, 55, 96 e 373 a 375.

[0058] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade RPN7 do proteassoma 26S. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica a subunidade RPN7 do proteassoma 26S tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 6, 21 e 26.

[0059] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a regulador de tamanho de substrato de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a regulador de tamanho de substrato de proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 335 e 336.

[0060] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é uma sequência de nucleotídeos que codifica um gene relacionado à subunidade de corrente de proteassoma nuclear Cut8. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à corrente de proteassoma nuclear Cut8 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 337 a 340.

[0061] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a estabilizador de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a estabilizador de proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID n°s: 341 a 345.

[0062] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à protease de ubiquitina JAB1/Mov34/MPN/PAD-1. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à protease de ubiquitina JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 346 a 351.

[0063] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade beta pa28 de ativador de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade beta pa28 de ativador de proteassoma tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID n°: 352.

[0064] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 4. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 4 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID n°: 353.

[0065] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a membro da família

PAC2. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a membro da família PAC2 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 354.

[0066] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 3. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 3 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 355 a 357.

[0067] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um regulador de proteassoma PI31. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a regulador de proteassoma PI31 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 358 a 360.

[0068] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado contendo domínio PITH associado ao proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a domínio PITH associado ao proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 361 a 366.

[0069] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 367 a 370.

[0070] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a receptor da ubiquitina Rpn13 da subunidade do complexo de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a receptor da ubiquitina Rpn13 da

subunidade do complexo de proteassoma tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 371.

[0071] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é uma sequência de nucleotídeos que codifica um gene relacionado a domínio de ligação UCH do receptor-ubiquitina-proteassoma Rpn13. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a domínio de ligação UCH do receptor-ubiquitina-proteassoma Rpn13 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 373.

[0072] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 368 a 371.

[0073] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à proteína que interage com a proteína 1 de ligação Tat (TBP-1) (TBPIP). De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o gene relacionado a TBPIP tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 376.

[0074] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 90% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 95% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0075] De acordo com algumas modalidades, a célula hospedeira é uma planta, células vegetais, plantas descendentes de qualquer geração, sementes, produtos vegetais e semelhantes.

[0076] De acordo com algumas modalidades, é fornecido um método de produção de uma planta, ou um produto básico da mesma, transformado com um polinucleotídeo compreendendo um dsRNA tendo uma sequência polinucleotídica que é cerca de 95% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo da praga, em que a ingestão do polinucleotídeo de dsRNA pela praga resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento da mesma.

[0077] Exemplos não limitativos de produtos básicos (*commodity*) adequados incluem farinhas, óleos, grãos ou sementes triturados ou integrais de uma planta, ou qualquer produto alimentar compreendendo qualquer refeição, óleo ou grão triturado ou integral de uma planta ou semente recombinante contendo uma ou mais das sequências da presente invenção.

[0078] De acordo com algumas modalidades, é fornecida uma composição compreendendo um dsRNA com uma sequência polinucleotídica que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo da praga, em que a ingestão do dito polinucleotídeo de dsRNA pela dita praga resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento da mesma.

[0079] De acordo com algumas modalidades, a praga pode ser um bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*).

[0080] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 314 e 335 a 376.

[0081] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 26.

[0082] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 6.

[0083] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 12, 14, 16 a 18, 20, 21, 24, 26, 335, 341 a 343, 346 a 348, 352 a 355, 359, 361, 362, 367 e 371 a 374.

[0084] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a complexo proteassomal. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o gene relacionado a complexo proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 3, 6, 7, 8, 10, 20, 21 e 26.

[0085] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade alfa proteassomal. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos do gene da subunidade alfa proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 7, 8, 47, 57, 63, 121, 124, 125, 252 e 272.

[0086] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade beta proteassomal. De acordo com algumas modalidades, o gene da subunidade beta proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 3, 10, 19, 20, 30, 55, 96 e 373 a 375.

[0087] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade RPN7 do proteassoma 26S. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica a subunidade RPN7 do proteassoma 26S tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 6, 21 e 26.

[0088] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a regulador de

tamanho de substrato de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a regulador de tamanho de substrato de proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 335 e 336.

[0089] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é uma sequência de nucleotídeos que codifica um gene relacionado à subunidade de corrente de proteassoma nuclear Cut8. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à corrente de proteassoma nuclear Cut8 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 337 a 340.

[0090] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a estabilizador de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a estabilizador de proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID n°s: 341 a 345.

[0091] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à protease de ubiquitina JAB1/Mov34/MPN/PAD-1. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à protease de ubiquitina JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 346 a 351.

[0092] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade beta pa28 de ativador de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade beta pa28 de ativador de proteassoma tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID n°: 352.

[0093] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 4. De acordo com algumas modalidades, o gene

relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 4 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 353.

[0094] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a membro da família PAC2. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a membro da família PAC2 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 354.

[0095] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 3. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 3 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 355 a 357.

[0096] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um regulador de proteassoma PI31. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a regulador de proteassoma PI31 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 358 a 360.

[0097] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado contendo domínio PITH associado ao proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a domínio PITH associado ao proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 361 a 366.

[0098] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 367 a 370.

[0099] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a receptor da ubiquitina Rpn13 da subunidade do complexo de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a receptor da ubiquitina Rpn13 da subunidade do complexo de proteassoma tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 371.

[0100] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é uma sequência de nucleotídeos que codifica um gene relacionado a domínio de ligação UCH do receptor-ubiquitina-proteassoma Rpn13. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a domínio de ligação UCH do receptor-ubiquitina-proteassoma Rpn13 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 373.

[0101] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 368 a 371.

[0102] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à proteína que interage com a proteína 1 de ligação Tat (TBP-1) (TBPIP). De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o gene relacionado a TBPIP tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 376.

[0103] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 90% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 95% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0104] De acordo com algumas modalidades, a composição pode estar na forma de um sólido, líquido, pó, suspensão, emulsão, pulverização, encapsulamento, microesferas, partículas carreadoras, película, matriz, umidificação de solo ou tratamento de sementes.

[0105] De acordo com algumas modalidades, a composição compreende nanopartículas e/ou lipossomas que incorporam o dsRNA.

[0106] De acordo com algumas modalidades, a composição compreende ainda um ou mais componentes selecionados do grupo que consiste em um agente carreador, um tensoativo, um organossilicone, uma molécula herbicida polinucleotídica, uma molécula herbicida não polinucleotídica, um pesticida não polinucleotídico, um fungicida, um protetor, um fertilizante, um micronutriente, um atrativo para insetos e um regulador de crescimento de insetos.

[0107] De acordo com algumas modalidades, é fornecido um método para controlar a prevenção, melhoria e/ou tratamento da infestação de uma planta com uma praga, o método compreendendo fornecer à planta e/ou à praga um dsRNA com uma sequência polinucleotídica que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a um fragmento de um gene alvo da praga, em que a ingestão do polinucleotídeo de dsRNA pela praga resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento da mesma.

[0108] De acordo com algumas modalidades, é fornecido um método para a morte direcionada de um bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*), o método compreendendo fornecer (administrar, alimentar, pulverizar) o bicudo-vermelho-das-palmeiras com um dsRNA tendo uma sequência polinucleotídica que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a um fragmento de um gene alvo bicudo-vermelho-das-palmeiras, em que o fornecimento do dsRNA (por exemplo, como resultado da ingestão) à praga resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento da mesma.

De acordo com algumas modalidades, o bicudo-vermelho-das-palmeiras é uma larva do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0109] De acordo com algumas modalidades, a praga pode ser um bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*) e o dsRNA pode ser um dsRNA direcionado a um gene vital para a sobrevivência e/ou propagação do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0110] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 1 a 314 e 335 a 376.

[0111] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 1 a 26.

[0112] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 1 a 6.

[0113] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 1 a 12, 14, 16 a 18, 20, 21, 24, 26, 335, 341 a 343, 346 a 348, 352 a 355, 359, 361, 362, 367 e 371 a 374.

[0114] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a complexo proteassomal. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a complexo proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 3, 6, 7, 8, 10, 20, 21 e 26.

[0115] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade alfa proteassomal. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos do gene da subunidade alfa proteassomal tem uma sequência de

codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 7, 8, 47, 57, 63, 121, 124, 125, 252 e 272.

[0116] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade beta proteassomal. De acordo com algumas modalidades, o gene da subunidade beta proteassomal tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 3, 10, 19, 20, 30, 55, 96 e 373 a 375.

[0117] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade RPN7 do proteassoma 26S. De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica a subunidade RPN7 do proteassoma 26S tem uma sequência de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 6, 21 e 26.

[0118] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a regulador de tamanho de substrato de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a regulador de tamanho de substrato de proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 335 e 336.

[0119] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é uma sequência de nucleotídeos que codifica um gene relacionado à subunidade de corrente de proteassoma nuclear Cut8. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à corrente de proteassoma nuclear Cut8 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 337 a 340.

[0120] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a estabilizador de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a estabilizador de proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID nºs: 341 a 345.

[0121] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à protease de ubiquitina JAB1/Mov34/MPN/PAD-1. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à protease de ubiquitina JAB1/Mov34/MPN/PAD-1 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 346 a 351.

[0122] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade beta pa28 de ativador de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade beta pa28 de ativador de proteassoma tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 352.

[0123] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 4. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 4 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 353.

[0124] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a membro da família PAC2. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a membro da família PAC2 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 354.

[0125] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 3. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à chaperona de montagem de proteassoma 3 tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 355 a 357.

[0126] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um regulador de proteassoma PI31. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a regulador de

proteassoma PI31 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 358 a 360.

[0127] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado contendo domínio PITH associado ao proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a domínio PITH associado ao proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 361 a 366.

[0128] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma tem uma sequência de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 367 a 370.

[0129] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado a receptor da ubiquitina Rpn13 da subunidade do complexo de proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a receptor da ubiquitina Rpn13 da subunidade do complexo de proteassoma tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 371.

[0130] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é uma sequência de nucleotídeos que codifica um gene relacionado a domínio de ligação UCH do receptor-ubiquitina-proteassoma Rpn13. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado a domínio de ligação UCH do receptor-ubiquitina-proteassoma Rpn13 tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 373.

[0131] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma. De acordo com algumas modalidades, o gene relacionado à subunidade 26S não ATPase de Proteassoma tem uma sequência

de codificação selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 368 a 371.

[0132] De acordo com algumas modalidades, o gene para o qual o dsRNA é direcionado é um gene relacionado à proteína que interage com a proteína 1 de ligação Tat (TBP-1) (TBPIP). De acordo com algumas modalidades, a sequência de nucleotídeos que codifica o gene relacionado a TBPIP tem uma sequência de codificação estabelecida na SEQ ID nº: 376.

[0133] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 90% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA tem uma sequência polinucleotídica sendo cerca de 95% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0134] De acordo com algumas modalidades, o fornecimento do dsRNA à planta compreende aplicar o dsRNA ou uma composição compreendendo o mesmo na planta; injetar o dsRNA ou uma composição compreendendo o mesmo na planta; entregar a composição à planta por absorção através do solo; colocar alimento/ração compreendendo o dsRNA na proximidade da planta ou da praga; expressar o dsRNA endogenamente na planta, aplicar uma composição compreendendo bactérias que expressam o dsRNA na planta, ou qualquer combinação dos mesmos.

[0135] Certas modalidades da presente divulgação podem incluir algumas, todas ou nenhuma das vantagens acima. Uma ou mais vantagens técnicas podem ser facilmente evidentes para aqueles versados na técnica a partir das figuras, descrições e reivindicações incluídas neste documento. Além disso, embora vantagens específicas tenham sido enumeradas acima, várias modalidades podem incluir todas, algumas ou nenhuma das vantagens enumeradas.

[0136] Além dos aspectos e modalidades exemplares descritos acima, outros aspectos e modalidades se tornarão aparentes por referência às figuras e pelo estudo das seguintes descrições detalhadas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0137] A invenção será agora descrita em relação a certos exemplos e modalidades com referência às seguintes figuras ilustrativas para que possa ser mais completamente entendida.

[0138] A **Figura 1** é um gráfico representativo que descreve a porcentagem de larvas mortas do bicudo-vermelho-das-palmeiras obtida como resultado da alimentação das larvas com 1 micrograma/ml de dsRNA direcionado às sequências de RNA indicadas do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0139] A **Figura 2** é um gráfico representativo que descreve a porcentagem de larvas mortas do bicudo-vermelho-das-palmeiras como resultado da alimentação das larvas com uma combinação de 1 micrograma/ml de dsRNA direcionado às sequências de RNA proteassomal do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

[0140] A **Figura 3** é um gráfico representativo que descreve a porcentagem de larvas mortas do bicudo-vermelho-das-palmeiras obtida como resultado da alimentação das larvas com diferentes concentrações de dsRNA direcionado às sequências de RNA da subunidade alfa proteassomal do bicudo-vermelho-das-palmeiras (mic = micrograma).

[0141] A **Figura 4** descreve a porcentagem média de larvas mortas contadas 14 dias após a alimentação das larvas com 1 micrograma/ml de dsRNA direcionado ao mRNA que codifica proteínas proteassomais ou associadas ao proteassoma em comparação com a porcentagem média de morte celular obtida com direcionamento a proteínas não proteassomais.

[0142] A **Figura 5** mostra a presença de dsRNA em amostras de folhas obtidas de árvores injetadas com o dsRNA em seu caule (DAI = dias após a injeção).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0143] O que se segue é uma descrição detalhada da invenção fornecida para auxiliar os versados na técnica na prática da presente invenção. Aqueles versados na técnica podem fazer modificações e variações nas modalidades descritas neste documento sem se afastar do espírito ou escopo da presente invenção.

[0144] A presente invenção fornece dsRNAs, composições compreendendo os mesmos e métodos de uso de dsRNA para controle genético de infestações de pragas. Especificamente, a presente invenção se refere à inibição com especificidade de sequência da expressão de sequências codificantes usando RNA de fita dupla (dsRNA), incluindo pequenos RNA interferentes (siRNA), para atingir os níveis pretendidos de controle de pragas.

[0145] Conforme usado neste documento, o termo "infestação" se refere a uma planta sendo invadida por um parasita ou praga, como, mas não se limitando a, uma palmeira sendo invadida por um bicudo-vermelho-das-palmeiras. De acordo com algumas modalidades, a gravidade de uma infestação pode ser avaliada por um grau de dano causado à planta infestada, como por observação de amarelamento da árvore, murchamento das folhas da árvore, perda de copa e morte da árvore. De acordo com algumas modalidades, a gravidade de uma infestação pode ser avaliada por perfuração no tronco da árvore ou por corte do tronco. De acordo com algumas modalidades, a gravidade de uma infestação pode ser avaliada por análise bioacústica.

[0146] Os inventores descobriram neste documento que, alimentar dsRNA (ou uma composição contendo o mesmo) incluindo sequências encontradas dentro de uma ou mais sequências de nucleotídeos

expressas de uma praga, especificamente do bicudo-vermelho-das-palmeiras, resulta na inibição de uma ou mais funções biológicas dentro da praga. Particularmente, os inventores descobriram que alimentar as moléculas de dsRNA direcionadas a uma ou mais das SEQ ID n°s: 1 a 314 e 335 a 376, cada possibilidade é uma modalidade separada, a pragas de planta, como o bicudo-vermelho-das-palmeiras, resulta na morte ou inibição do desenvolvimento e diferenciação da praga que ingere essas composições.

[0147] Verificou-se ainda que as sequências de nucleotídeos que, quando transcritas, formam um dsRNA complementar a uma sequência derivada do bicudo-vermelho-das-palmeiras, podem ser usadas para gerar plantas, resistentes à infestação pela praga. Isso facilita a disponibilização do dsRNA na dieta da praga se/quando a praga se alimenta do hospedeiro transgênico ou de alimento/ração/isca compreendendo o dsRNA, resultando na supressão da expressão de um ou mais genes nas células da praga e, em última análise, na morte, retardo de crescimento ou outra inibição da praga.

[0148] De acordo com algumas modalidades, as moléculas de dsRNA podem ser introduzidas em composições nutricionais das quais a praga depende como fonte de alimento, tornando assim a composição nutricional disponível para a praga para alimentação. A ingestão da composição nutricional contendo as moléculas de fita dupla ou siRNA resulta na absorção das moléculas pelas células da praga, resultando na inibição da expressão de pelo menos um gene alvo nas células da praga. A inibição do gene alvo exerce um efeito deletério sobre a praga. De acordo com algumas modalidades, o gene alvo é altamente seletivo para a praga específica, de modo que, após a ingestão, as moléculas de fita dupla ou siRNA são prejudiciais à praga específica, enquanto outros organismos, incluindo humanos, estão seguros.

[0149] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA inclui uma sequência polinucleotídica que é cerca de 95% a cerca de 100% complementar a pelo menos um segmento de um gene alvo da praga, de

modo que a ingestão do dsRNA pela praga resulte em mortalidade e/ou retardo de crescimento da mesma.

[0150] De acordo com algumas modalidades, a praga pode ser um bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*).

[0151] De acordo com algumas modalidades, o gene ao qual a supressão é direcionada pode codificar uma proteína essencial. Exemplos não limitativos da função adequada da proteína essencial incluem formação de músculo, formação de hormônio juvenil, regulação de hormônio juvenil, regulação e transporte de íons, síntese de proteínas, transporte e degradação, síntese de enzimas digestivas, manutenção do potencial de membrana celular, biossíntese de aminoácidos, degradação de aminoácidos, formação de espermatozoides, síntese de feromônio, detecção de feromônio, formação de antenas, formação de asa, formação de perna, desenvolvimento e diferenciação, formação de ovo, maturação larval, formação de enzima digestiva, síntese de hemolinfa, manutenção de hemolinfa, neurotransmissão, divisão celular, metabolismo de energia, respiração, uma função desconhecida e apoptose. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0152] De acordo com algumas modalidades, o gene alvo pode ser um gene expresso no intestino da praga.

[0153] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA inibe uma sequência de nucleotídeos (mRNA) selecionada do grupo que consiste em SEQ ID n°s: 1 a 314 e 335 a 376. Cada possibilidade é uma modalidade separada. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento de uma sequência de nucleotídeos (mRNA) dentro das células da praga, tal como qualquer uma das sequências de nucleotídeos estabelecidas nas SEQ ID n°s: 315 a 319 e 321 a 334 produzindo os dsRNAs. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0154] Como um exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um

segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 1. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 2. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 3. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 4. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 5. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 6. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 7. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 8. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 9. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 10. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 11. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 12. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 13. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar

a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 14. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 15. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 16. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 17. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 18. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 19. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 20. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 21. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 22. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 23. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 24. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 25. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeos complementar a pelo menos um segmento dos RNAs estabelecidos na SEQ ID nº: 26.

[0155] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode ser um RNA em alça curta (shRNA), uns pequenos RNAs interferentes (siRNAs), ou um miRNA. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0156] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode incluir pelo menos duas sequências de codificação ou/e regiões não traduzidas (UTRs) que são arranjadas em uma orientação senso e antissenso em relação a pelo menos um promotor, em que a sequência de nucleotídeos que compreende uma fita senso e uma fita antissenso é ligada ou conectada por uma sequência espaçadora de pelo menos cerca de cinco a cerca de mil nucleotídeos.

[0157] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode ser um shRNA de pelo menos 100 bp que, subsequentemente, seja dentro da célula hospedeira ou quando ingerido pela praga, se torna digerido em siRNA.

[0158] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode ser um siRNA incluindo cerca de 19 a cerca de 23 nucleotídeos.

[0159] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA é um shRNA que compreende cerca de 23 a cerca de 500 nucleotídeos, cerca de 100 a cerca de 2.000 nucleotídeos, 140 a cerca de 400 nucleotídeos ou qualquer outro número adequado de nucleotídeos entre 23 e 2.000 nucleotídeos. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA compreende pelo menos 140 bp. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA compreende pelo menos 200 bp. De acordo com algumas modalidades, o segmento complementar do dsRNA pode incluir cerca de pelo menos 19, 21, 23, 25, 40, 60, 80, 100, 125, 140, 200, 250, 300 ou mais nucleotídeos contíguos derivados de ou complementares a uma ou mais das sequências em SEQ ID n°s: 1 a 314 e 335 a 376. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0160] De acordo com algumas modalidades, o segmento complementar do dsRNA pode ter pelo menos cerca de 80, 81, 82,

83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou cerca de 100% de complementaridade com um segmento de pelo menos uma das sequências de nucleotídeos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID nºs: 1 a 314 e 335 a 376. Cada possibilidade é uma modalidade separada. De acordo com algumas modalidades, um segmento da pelo menos uma sequência de nucleotídeos não inclui a cauda poli-A da sequência de nucleotídeos.

[0161] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode ter uma fita senso estabelecida em qualquer uma das SEQ ID nºs: 315 a 319 e 321 abaixo. De acordo com algumas modalidades, o T (timidina) estabelecido na listagem de sequência do dsRNA pode ser substituído por um U, representando Uracila.

[0162] Por exemplo, as sequências de dsRNA podem ser expressas como uma estrutura em alça e haste e laço tomando um primeiro segmento correspondente a um segmento de uma sequência selecionada de SEQ ID nº: 1 a 314 e 335 a 376, como uma sequência selecionada de SEQ ID nº: 315 a 319 e 321, ligando esta sequência a um segundo segmento que é uma região espaçadora que não é homóloga ou complementar ao primeiro segmento, e ligando este a um terceiro segmento que transcreve um RNA, pelo menos uma porção da qual é substancialmente complementar ao primeiro segmento. Tal construção forma uma estrutura de haste e laço por hibridização do primeiro segmento com o terceiro segmento e uma forma de estrutura de laço compreendendo o segundo segmento.

[0163] De acordo com algumas modalidades, a sequência espaçadora pode ser uma região compreendendo qualquer sequência de nucleotídeos que facilite a formação da estrutura secundária entre cada repetição, quando isso for necessário. A sequência espaçadora pode, alternativamente, compreender qualquer combinação de nucleotídeos ou homólogos dos mesmos que são capazes de serem ligados covalentemente a uma molécula de ácido nucleico. A sequência espaçadora pode compreender uma sequência de nucleotídeos de pelo menos cerca de 10 a 100 nucleotídeos

de comprimento ou, alternativamente, pelo menos cerca de 100 a 200 nucleotídeos de comprimento, pelo menos cerca de 200 a 400 nucleotídeos de comprimento, ou pelo menos cerca de 400 a 500 nucleotídeos de comprimento. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0164] Tal como utilizado neste documento, o termo "ácido nucleico" refere-se a um polímero de fita simples ou dupla de bases desoxirribonucleotídicas ou ribonucleotídicas lidas da extremidade 5' a 3'. O "ácido nucleico" também pode conter, opcionalmente, bases de nucleotídeos de ocorrência não naturais ou alteradas que permitem a leitura correta por uma polimerase e não reduzem a expressão de um polipeptídeo codificado por esse ácido nucleico. Os termos "sequência de nucleotídeos" e "sequência de ácido nucleico" podem ser usados de forma intercambiável e referem-se a ambas as fitas senso e antissenso de um ácido nucleico como fitas simples individuais ou em duplex. De acordo com algumas modalidades, o termo "ácido ribonucleico" (RNA) inclui RNAi (RNA inibitório), dsRNA (RNA de fita dupla), siRNA (pequeno RNA interferente), mRNA (RNA mensageiro), miRNA (microRNA), tRNA (RNA de transferência, carregado ou descarregado com um aminoácido acilado correspondente) e cRNA (RNA complementar). De acordo com algumas modalidades, o termo RNA com referência ao gene alvo pode se referir ao mRNA do gene alvo. De acordo com algumas modalidades, o termo "ácido desoxirribonucleico" (DNA) inclui cDNA e DNA genômico e híbridos de DNA-RNA.

[0165] O termo "segmento de ácido nucleico", "segmento de sequência de nucleotídeos" ou mais geralmente "segmento" pode incluir ambas as sequências genômicas, sequências de RNA ribossomal, sequências de RNA de transferência, sequências de RNA mensageiro, sequências de operon e sequências de nucleotídeos projetados menores que expressam ou podem ser adaptados para expressar proteínas, polipeptídeos ou peptídeos. De acordo com algumas modalidades, o termo "segmento" pode se referir a parte do DNA/RNA que codifica um gene, como uma parte de qualquer

uma das sequências de nucleotídeos (mRNA), estabelecidas em SEQ ID nº: 1 a 314 e 335 a 376.

[0166] Tal como utilizado neste documento, o termo "substancialmente homólogo" ou "homologia substancial", com referência a uma sequência de ácido nucleico, inclui uma sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições rigorosas com a sequência de codificação conforme estabelecida em qualquer uma das SEQ ID nº: 1 a 314 e 335 a 376, ou complementos das mesmas. Sequências que hibridizam sob condições rigorosas com qualquer uma das SEQ ID nº: 1 a 314 e 335 a 376, ou complementos das mesmas, são aquelas que permitem que um alinhamento antiparalelo ocorra entre as duas sequências, e as duas sequências são então capazes, sob condições rigorosas, de formar ligações de hidrogênio com bases correspondentes na fita oposta para formar uma molécula duplex que é suficientemente estável sob as condições rigorosas para ser detectável usando métodos bem conhecidos na técnica. Sequências substancialmente homólogas têm preferencialmente cerca de 70% a cerca de 80% de identidade de sequência, ou mais preferencialmente cerca de 80% a cerca de 85% de identidade de sequência, ou mais preferencialmente cerca de 90% a cerca de 95% de identidade de sequência, a cerca de 99% de identidade de sequência, com as sequências de nucleotídeos referentes conforme estabelecidas em qualquer uma das SEQ ID nºs: 1 a 314 e 335 a 376, conforme estabelecido na listagem de sequência, ou complementos das mesmas. Desvios da complementaridade completa são permitidos, desde que tais desvios não excluam completamente a capacidade das moléculas de formar uma estrutura de fita dupla.

[0167] Conforme usado neste documento, o termo "identidade de sequência", "similaridade de sequência" ou "homologia" é usado para descrever relações de sequência entre duas ou mais sequências de nucleotídeos. A porcentagem de "identidade de sequência" entre duas sequências é determinada pela comparação de duas sequências alinhadas de forma otimizada. Uma sequência que é idêntica em todas as posições em

comparação a uma sequência de referência é considerada idêntica à sequência de referência e vice-versa. Uma primeira sequência de nucleotídeos quando observada na direção 5' a 3' é considerada um "complemento" de, ou complementar a, uma segunda sequência de nucleotídeos de referência observada na direção 3' a 5' se a primeira sequência de nucleotídeos exibir completa complementaridade com a segunda sequência ou sequência de referência. Tal como utilizado neste documento, as moléculas de sequência de ácido nucleico são ditas como exibindo "complementaridade completa" quando cada nucleotídeo de uma das sequências lidas 5' a 3' for complementar a cada nucleotídeo da outra sequência quando lida 3' a 5'. Uma sequência de nucleotídeos que é complementar a uma sequência de nucleotídeos de referência exibirá uma sequência idêntica à sequência complementar reversa da sequência de nucleotídeos de referência. Estes termos e descrições são bem definidos na técnica e são facilmente compreendidos por aqueles versados na técnica.

[0168] Tal como utilizado neste documento, o termo "proteassoma" refere-se a qualquer complexo ou proteína que degrada proteínas por proteólise nas células. Na estrutura, o proteassoma é um complexo cilíndrico contendo um "núcleo" de quatro anéis empilhados formando um poro central. Cada anel é composto por sete proteínas individuais. Os dois anéis internos são feitos de sete subunidades beta que contêm de três a sete sítios ativos de protease. Cada um dos dois anéis externos contém sete subunidades alfa, cuja função é manter um "portão" através do qual as proteínas entram no barril. As subunidades alfa são controladas por ligação a estruturas "de tampa" ou partículas reguladoras que reconhecem marcadores de poliubiquitina fixados a substratos de proteína e iniciam o processo de degradação. O sistema geral de ubiquitinação e degradação proteassomal é conhecido como sistema ubiquitina-proteassoma.

[0169] Conforme usado neste documento, os termos "complexo proteassomal", "proteína proteassomal" e "proteína associada ao

proteassoma” referem-se a qualquer complexo ou proteína que faz parte ou está associado ao sistema ubiquitina-proteassoma.

[0170] De acordo com algumas modalidades, as sequências de nucleotídeos estabelecidas em SEQ ID n°s: 3, 6, 7, 8, 10, 19 a 21, 21, 26, 30, 47, 55, 57, 63 e 335 a 376 são referidas neste documento como sequências que codificam para proteínas proteassomais ou proteínas associadas ao proteassoma.

[0171] A sequência do nucleotídeo que codifica o dsRNA pode ser construída a partir de uma sequência que funciona na supressão de um único gene ou família de genes em uma ou mais pragas-alvo, ou que a sequência de DNA pode ser construída como uma quimera a partir de uma pluralidade de sequências de DNA.

[0172] De acordo com algumas modalidades, a presente invenção fornece tecnologias de DNA recombinante para reprimir pós-transcricionalmente ou inibir a expressão de um gene alvo na célula de uma praga para fornecer um efeito protetor de praga, por exemplo, alimentando à praga uma ou mais moléculas de ácido ribonucleico (RNA) de fita dupla ou pequenas interferentes transcritas de toda ou uma porção de uma sequência de codificação alvo, controlando assim a infestação. De acordo com algumas modalidades, o DNA recombinante codifica a transcrição do dsRNA divulgado neste documento. De acordo com algumas modalidades, o DNA pode ser introduzido no genoma de uma célula hospedeira, tal como, mas não se limitando a, a planta para a qual se busca proteção ou células hospedeiras que podem ser entregues à planta como um alimento/isca para a praga.

[0173] De acordo com algumas modalidades, plantas transgênicas que (a) contêm sequências de nucleotídeos que codificam os construtos de DNA recombinante sintético ou de ocorrência não natural para transcrever as moléculas de dsRNA para controlar infestações de pragas de plantas e (b) exibem resistência e/ou tolerância aprimorada a infestações de insetos, são fornecidas neste documento.

[0174] Composições contendo as sequências de nucleotídeos de dsRNA da presente invenção para uso em aplicações tópicas em plantas ou em animais ou no ambiente de um animal para alcançar a eliminação ou redução da infestação de pragas também são descritas.

[0175] Um vetor de DNA recombinante pode, por exemplo, ser um plasmídeo linear ou 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 do hospedeiro bacteriano. Além disso, um vetor bacteriano pode ser um vetor de expressão. As moléculas de ácido nucleico conforme estabelecidas em SEQ ID nºs: 315 a 319 e 321 a 334 podem, por exemplo, serem inseridas em um vetor sob o controle de um promotor adequado que funciona nos hospedeiros para acionar a expressão. 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 e da célula hospedeira particular com a qual é compatível.

[0176] Um vetor de transformação pode conter sequências de mais de um gene, permitindo assim a produção de mais de um dsRNA para inibir a expressão de dois ou mais genes em células de uma praga alvo. De acordo com algumas modalidades, segmentos de DNA cuja sequência corresponde àquela presente em diferentes genes podem ser combinados em um único segmento de DNA composto para expressão em uma planta transgênica. Alternativamente, um plasmídeo da presente invenção já contendo pelo menos um segmento de DNA pode ser modificado pela inserção sequencial de segmentos de DNA adicionais, por exemplo, entre o intensificador e o promotor e as sequências terminadoras.

[0177] De acordo com algumas modalidades, a célula hospedeira é uma planta, células vegetais, plantas descendentes de qualquer

geração, sementes, produtos vegetais e semelhantes. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0178] Métodos para a criação de plantas transgênicas e expressão de ácidos nucleicos heterólogos em plantas, em particular, são conhecidos e podem ser usados com os ácidos nucleicos fornecidos neste documento para preparar plantas transgênicas que apresentam suscetibilidade reduzida à alimentação por um organismo de praga alvo, como o bicudo-vermelho-das-palmeiras. Os vetores de transformação de plantas podem ser preparados, por exemplo, inserindo ou clonando os ácidos nucleicos produtores de dsRNA divulgados neste documento em vetores de transformação de plantas e introduzindo-os nas plantas. Um sistema de vetor conhecido foi derivado da modificação do sistema natural de transferência de genes de *Agrobacterium tumefaciens*.

[0179] Uma planta transgênica formada usando métodos de transformação de *Agrobacterium* tipicamente contém uma única sequência de DNA recombinante simples inserida em um cromossomo e é referida como um evento transgênico. Essas plantas transgênicas podem ser referidas como sendo heterozigóticas para a sequência exógena inserida. Uma planta transgênica homozigótica em relação a um transgene pode ser obtida por autofecundação de uma planta transgênica segregante independente para produzir uma semente F1. Um quarto da semente F1 produzida será homozigótica em relação ao transgene. A germinação de uma semente F1 resulta em plantas que podem ser testadas para heterozigosidade ou homozigosidade, por exemplo, usando um ensaio SNP ou um ensaio de amplificação térmica que permite a distinção entre heterozigotos e homozigotos (ou seja, um ensaio de zigosidade).

[0180] De acordo com algumas modalidades, a planta pode ser qualquer planta monocotiledônea e dicotiledônea. De acordo com algumas modalidades, a planta pode ser palmeiras. Exemplos não limitativos de palmeiras da família Arecaceae incluem coqueiro (*Cocos nucifera*),

dendê (*Elaeis guineensis*), *Areca catechu*, *Arenga pinnata*, *Borassus flabellifer*, *Calamus merillii*, *Cargota maxima*, *Cargota cumingii*, *Corypha gebanga*, *Corypha elata*, *Livistona decipiens*, *Metroxylon sagu*, *Oreodoxa regia*, *Phoenix sylvestris*, *Phoenix canariensis*, *Phoenix dactylifera* (tamareira), *Sabal umbraculifera*, *Trachycarpus fortunei*, *Washingtonia* spp. e outras plantas semelhantes a palmeiras, como *Agave Americana*, *Saccharum officinarum* e *Chamaerops humilis* (conhecida como Palmeira anã do Mediterrâneo). Exemplos não limitativos de plantas adequadas incluem alfafa, endro, maçã, damasco, alcachofra, rúcula, aspargos, abacate, banana, cevada, feijão, beterraba, amora, mirtilo, brócolis, couve de Bruxelas, repolho, canola, meloa, cenoura, mandioca, couve-flor, aipo, cereja, coentro, cítrico, clementina, café, milho, algodão, pepino, abeto de Douglas, berinjela, endívia, escarola, eucalipto, erva-doce, figos, cabaça, uva, toranja, orvalho de mel, jicama, kiwi, alface, alho-poró, limão, lima, pinho Loblolly, manga, melão, cogumelo, noz, aveia, quiabo, cebola, laranja, uma planta ornamental, palmeiras, mamão, salsa, ervilha, pêssigo, amendoim, pera, pimenta, caqui, pinho, abacaxi, plátano, ameixa, romã, choupó, batata, abóbora, marmelo, pinho radiata, radicchio, rabanete, framboesa, arroz, centeio, sorgo, pinho do Sul, soja, espinafre, abóbora branca, morango, beterraba sacarina, cana-de-açúcar, girassol, batata doce, goma-doce, tangerina, chá, tabaco, tomate, turfa, videira, melancia, trigo, inhame e plantas de abobrinha. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0181] De acordo com algumas modalidades, a palmeira é selecionada de *Phoenix dactylifera*.

[0182] De acordo com algumas modalidades, a célula hospedeira pode ser cepas não patogênicas ou atenuadas de microrganismos, por exemplo, bactérias, que podem ser usadas como um carreador para os agentes de controle de insetos. Os microrganismos podem ser modificados para expressar uma sequência de nucleotídeos de um gene alvo para produzir moléculas de RNA compreendendo sequências de RNA homólogas ou complementares às sequências de RNA tipicamente encontradas nas células de

um inseto. De acordo com algumas modalidades, os microrganismos podem servir como um vetor ou carreador do dsRNA e podem, por exemplo, ser pulverizados na planta, fornecidos ao solo nas proximidades da planta ou adicionados ao alimento/ração/isca fornecidos nas proximidades da planta. A exposição dos insetos aos microrganismos resulta na ingestão dos microrganismos e na regulação negativa da expressão de genes-alvo mediados direta ou indiretamente pelas moléculas de RNA ou fragmentos ou derivados dos mesmos.

[0183] De acordo com algumas modalidades, a célula hospedeira pode ser qualquer uma de uma ampla variedade de hospedeiros de microrganismos procarióticos e eucarióticos. O termo "microrganismo" inclui espécies microbianas procarióticas e eucarióticas, como bactérias, fungos e algas. Os fungos incluem leveduras e fungos filamentosos, entre outros. Procariontes ilustrativos, tanto Gram-negativos quanto Gram-positivos, incluem *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella* e *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiceae*, como *Rhizobium*; *Spirillaceae*, tais como fotobactéria, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, como *Pseudomonas* e *Acetobacter*; *Azotobacteraceae*, *Actinomycetales* e *Nitrobacteraceae*. Entre os eucariontes encontram-se fungos, como *Phycomycetes* e *Ascomycetes*, que inclui leveduras, como *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces*; e *Basidiomycetes*, como *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces* e semelhantes. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0184] De acordo com algumas modalidades, o microrganismo pode ser conhecido por habitar os caules ou troncos das plantas, o filopiano (a superfície das folhas da planta) e/ou a rizosfera (o solo em torno das raízes das plantas) das plantas. Exemplos não limitativos de tais microrganismos incluem bactérias, algas e fungos. De particular interesse são os microrganismos, como bactérias, por exemplo, gênero *Bacillus* (incluindo as espécies e subespécies *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis kurstaki*

HD-73, *B. thuringiensis* sotto, *B. thuringiensis* berliner, *B. thuringiensis* thuringiensis, *B. thuringiensis* tolworthi, *B. thuringiensis* dendrolimus, *B. thuringiensis* alesti, *B. thuringiensis* galleriae, *B. thuringiensis* aizawai, *B. thuringiensis* subtoxicus, *B. thuringiensis* entomocidus, *B. thuringiensis* tenebrionis e *B. thuringiensis* san diego); *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Zanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* e *Alcaligenes*; fungos, particularmente leveduras, por exemplo, gêneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium*. De particular interesse são as espécies de bactérias da fitosfera como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes eutrophus* e *Azotobacter vinlandii*; e espécies de levedura da fitosfera, tais como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* e *Aureobasidium pollulans*. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0185] Exemplos não limitativos de hospedeiros bacterianos adequados que podem ser usados para produzir dsRNAs de controle de insetos incluem *E. coli*, *Bacillus* sp. (por exemplo, *B. thuringiensis*), *Pseudomonas* sp., *Photobacterium* sp., *Xenorhabdus* sp., *Serratia entomophila* e *Serratia* sp. relacionados, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. laterosporus*, *B. popilliae*, *Clostridium bifermentans* e outras espécies de *Clostridium*, ou outras bactérias gram-positivas formadoras de esporos. Cada possibilidade é uma modalidade separada.

[0186] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA, conforme divulgado neste documento, pode ser incorporado em um misturador de pulverização e aplicado à superfície de um hospedeiro, como uma

planta hospedeira. Sem ser limitado por nenhuma teoria, a ingestão do dsRNA por um inseto entrega o dsRNA ao intestino do inseto e, subsequentemente, às células dentro do corpo do inseto. Em outra modalidade, a infecção do inseto pelo dsRNA por outros meios, como por injeção ou outros métodos físicos, também permite a entrega do dsRNA. Em ainda outra modalidade, as moléculas de dsRNA podem ser aplicadas diretamente na planta ou serem encapsuladas e aplicadas à superfície da planta. A ingestão da planta pelo inseto permite então a entrega do dsRNA ao inseto e resulta na regulação negativa de um gene alvo no hospedeiro.

[0187] Os métodos para introdução oral podem incluir a mistura direta de RNA com o alimento do inseto, bem como abordagens projetadas nas quais uma espécie que é usada como alimento é projetada para expressar o dsRNA ou siRNA e, em seguida, fornecida ao inseto a ser afetado. Em uma modalidade, por exemplo, as moléculas de dsRNA ou siRNA podem ser incorporadas ou sobrepostas por cima da dieta do inseto. Em outra modalidade, o RNA pode ser pulverizado sobre a superfície de uma planta. Em ainda outra modalidade, o dsRNA ou siRNA pode ser expresso por microrganismos e os microrganismos podem ser aplicados na superfície da planta ou introduzidos em uma raiz, caule ou tronco por um meio físico, como uma injeção. Em ainda outra modalidade, uma planta pode ser geneticamente modificada para expressar o dsRNA ou siRNA em uma quantidade suficiente para matar os insetos conhecidos por infectar a planta.

[0188] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode ser aplicado exogenamente na planta ou em seus arredores (por exemplo, solo).

[0189] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode ser aplicado exogenamente por meio de absorção de raiz ou injeção em vasos de plantas, em que esses insetos podem adquirir dsRNA naturalmente por meio da sucção ou mastigação. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode ser fornecido por meio de irrigação. De acordo com

algumas modalidades, o dsRNA pode ser pulverizado nas folhas e/ou no tronco da planta.

[0190] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode controlar larvas e pragas adultas. De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode matar as pragas adultas antes do acasalamento e/ou antes que as fêmeas tenham a chance de colocar ovos.

[0191] A eficiência do RNAi é principalmente acionada pela entrega/absorção de dsRNA intacto nas células e, portanto, depende do veículo de entrega que entrega o RNA exógeno com segurança e eficácia a uma célula alvo.

[0192] De acordo com algumas modalidades, a composição compreende nanopartículas que incorporam o dsRNA. As nanopartículas podem ser usadas para reduzir a degradação do dsRNA e aumentar a captação celular do dsRNA intacto. Nanopartículas poliméricas podem ser produzidas usando polímeros naturais e sintéticos. Estes podem ser utilizados devido à sua estabilidade, facilidade de modificação de superfície, bem como sua biodegradabilidade e segurança ambiental. De acordo com algumas modalidades, o polímero pode ser quitosana. As nanopartículas de quitosana podem ser projetadas para se autoacumularem com dsRNA por meio de forças eletrostáticas entre as cargas positivas e negativas dos grupos amino nos grupos quitosana e fosfato no eixo do ácido nucleico, respectivamente. Este método pode ser adequado com dsRNA longo, bem como com siRNAs. De acordo com algumas modalidades, as nanopartículas de quitosana podem então ser misturadas com a dieta e serem transmitidas por ingestão oral.

[0193] De acordo com algumas modalidades, a composição compreende lipossomas que incorporam o dsRNA. Os lipossomas são compostos por lipídios naturais, não são tóxicos e são facilmente biodegradáveis.

[0194] De acordo com algumas modalidades, o dsRNA pode ser quimicamente modificado em uma ou ambas as fitas para

melhorar a estabilidade, expandir a meia-vida do dsRNA *in vivo*, aumentar a biodistribuição e propriedades farmacocinéticas do dsRNA, direcionar o dsRNA para células específicas, aumentar a afinidade de ligação ao alvo e/ou melhorar a entrega do fármaco. Como um exemplo não limitativo, o dsRNA pode ser modificado para incluir grupos de metila na posição 2' do anel de ribosila da 2ª base do dsRNA. Como outro exemplo não limitativo, o dsRNA pode ser modificado para incluir uma saliência 3'.

[0195] De acordo com algumas modalidades, as modificações podem ser incluídas no dsRNA. De acordo com algumas modalidades, a modificação não impede que a composição de dsRNA sirva como substrato para Dicer. Em uma modalidade, uma ou mais modificações são feitas, que aumentam o processamento de Dicer do dsRNA. Em uma segunda modalidade, uma ou mais modificações são feitas, que resultam na geração de RNAi mais eficaz. Em uma terceira modalidade, uma ou mais modificações são feitas, que suportam um maior efeito de RNAi. Em uma quarta modalidade, uma ou mais modificações são feitas que resultam em maior potência por cada molécula de dsRNA a ser entregue à célula. As modificações podem ser incorporadas na região terminal 3', na região terminal 5', em ambas as regiões terminal 3' e terminal 5' ou, em alguns casos, em várias posições dentro da sequência. Com as restrições observadas acima em mente, qualquer número e combinação de modificações podem ser incorporados ao dsRNA. Quando várias modificações estão presentes, elas podem ser iguais ou diferentes. Modificações em bases, porções químicas de açúcar, eixo de fosfato e suas combinações são contempladas. Qualquer um dos terminais 5' pode ser fosforilado.

[0196] Os exemplos de modificações contempladas para o eixo de fosfato incluem fosfonatos, incluindo metilfosfonato, fosforotioato e modificações de fosfotriéster, como alquilfosfotriésteres e semelhantes. Exemplos de modificações contempladas para a porção química de açúcar incluem 2'-alquil pirimidina, tal como 2'-O-metila, 2'-fluoro, amino e modificações de desoxi e semelhantes (ver, por exemplo, Amarzguioui *et al.*, 2003). Exemplos

de modificações contempladas para os grupos de base incluem açúcares abásicos, pirimidinas modificadas com 2-O-alquila, 4-tiouracila, 5-bromouracila, 5-iodouracila e 5-(3-aminoalil)-uracila e semelhantes. Os ácidos nucleicos bloqueados, ou LNAs, também podem ser incorporados. Muitas outras modificações são conhecidas e podem ser usadas, desde que os critérios acima sejam satisfeitos.

[0197] Os exemplos a seguir são apresentados a fim de ilustrar mais completamente algumas modalidades da invenção. Eles não devem, de forma alguma, ser interpretados, no entanto, como limitando o amplo escopo da invenção. Uma pessoa versada na técnica pode facilmente conceber muitas variações e modificações dos princípios divulgados neste documento, sem se afastar do escopo da invenção.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1 - EXPERIÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO EM LARVAS DE BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS DE 2 A 4 CM

[0198] Larvas com 2 a 4 cm de comprimento foram cultivadas separadamente (de acordo com o tamanho) em um recipiente de plástico em forma de xícara e alimentadas com caules de cana-de-açúcar esmagados.

[0199] 1 ml de moléculas de dsRNA sintetizadas (Eupheria Biotech GmbH, Tatzberg 47 a 51, 01307 Dresden, Alemanha) de cada uma das sequências foi dissolvido em 1 µg/ml em ddH₂O e subsequentemente adicionado à cana-de-açúcar em um total de 2 microgramas por tratamento de larvas de bicudo-vermelho-das-palmeiras e repetido 5 vezes para cada composto.

[0200] Os recipientes foram então colocados em um local úmido escuro a uma temperatura de 25 a 30 °C. A viabilidade (morto = D, vivo = A, não responsivo = NR, lento = S) e mudança na mobilidade das larvas foi avaliada 3 vezes por semana (a cada 2 a 3 dias), durante 14 dias após o tratamento.

[0201] Os resultados obtidos para 7 compostos de dsRNA diferentes, direcionados ao RNA da SEQ ID nº indicada, são mostrados na Tabela 1. O Composto G é um dsRNA de 300 bp da proteína fluorescente verde, GFP, que foi usado como controle negativo. A sequência da fita senso do RNA G de controle é estabelecida na SEQ ID nº: 321.

[0202] Como pode ser visto na tabela, vários dos dsRNA causaram a morte de larvas de todos os tamanhos, enquanto outros foram particularmente vantajosos para as larvas maiores. Da mesma forma, alguns dos dsRNA provaram exercer um efeito deletério nas larvas dentro de uma semana, enquanto outros se mostraram eficazes apenas mais de uma semana após o tratamento.

TABELA 1: VIABILIDADE/MOTILIDADE DO BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS

		Tamanho das larvas				
		~ 4 cm	~ 4 cm	~ 3 cm	~ 2 cm	~ 2 cm
Dias pós-tratamento (dpt)	SEQ ID nº de RNA alvo	Viabilidade				
3	6	A	A	A	A	A
7	6	A	A	A	A	NR
11	6	A	D	D	A	D
14	6	S	D	D	A	D
3	4	A	A	A	A	A
7	4	A	S	A	A	A
11	4	A	D	A	D	A
14	4	D	D	D	D	A
3	2	A	A	A	A	A
7	2	A	A	A	A	A
11	2	A	A	D	A	A
14	2	S	D	D	A	A
3	G	A	A	D	A	A
7	G	A	A	D	A	A
11	G	A	A	D	A	A
14	G	A	A	D	A	A
3	3	A	A	A	A	A
7	3	A	A	NR	D	NR
11	3	D	A	D	D	D
14	3	D	A	D	D	D
3	1	A	A	A	A	A
7	1	A	A	A	A	A
11	1	D	A	A	A	A
14	1	D	A	D	A	D
3	5	A	A	A	A	A
7	5	A	A	S	A	S
11	5	A	D	S	A	D
14	5	A	D	D	D	D

EXEMPLO 2 - EXPERIÊNCIA DE ALIMENTAÇÃO EM
LARVAS DE BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS DE 1 A 2,5 CM

[0203] Larvas de 1 a 2,5 cm foram cultivadas em um recipiente de plástico em forma de xícara e alimentadas com caule de cana-de-açúcar esmagado, como acima.

[0204] 1 ml de moléculas de dsRNA sintetizadas (Eupheria Biotech GmbH, Tatzberg 47 a 51, 01307 Dresden, Alemanha) de cada uma das sequências indicadas (SEQ ID nº: 317 - SEQ ID direcionada para a sequência estabelecida em SEQ ID nº: 3, 332 - SEQ ID direcionada para a sequência estabelecida na SEQ ID nº: 8, 323 - SEQ ID direcionada para a sequência estabelecida na SEQ ID nº: 7, 320 - SEQ ID direcionada para a sequência estabelecida na SEQ ID nº: 6 e 333 - SEQ ID direcionada para a sequência estabelecida na SEQ ID nº: 20, bem como o dsRNA de controle (em que U é substituído por T)) foi dissolvido em ddH₂O e subsequentemente adicionado à cana-de-açúcar em um total de 1 micrograma por tratamento de larvas de bicudo-vermelho-das-palmeiras e repetido 5 vezes para cada concentração.

[0205] Os recipientes foram então colocados em um local úmido escuro a uma temperatura de 25 a 30 °C. A viabilidade e mudança na mobilidade das larvas foram avaliadas 3 vezes por semana (a cada 2 a 3 dias), durante 14 dias após o tratamento.

[0206] Os resultados obtidos são mostrados na **Figura 1**. O controle negativo é um dsRNA de 300 bp de proteína fluorescente verde (GFP). Como pode ser visto na **Figura 1**, todos os 5 dsRNAs testados causaram um aumento significativo na porcentagem de larvas mortas. Digno de nota, o dsRNA direcionado ao RNA estabelecido na SEQ ID nº: 3 e SEQ ID nº 20 mostrou um aumento marcante no número de larvas mortas 10 dias após o tratamento.

[0207] Experimentos semelhantes usando os dsRNAs estabelecidos na tabela 2 abaixo também foram realizados. Os dsRNAs

foram testados duas ou mais vezes. A média e o máximo de porcentagem obtida de morte de larvas para cada RNA alvo são igualmente estabelecidos na tabela 2.

TABELA 2 - PORCENTAGEM DE MORTE DE LARVAS

Seq ID nº do RNA alvo	Seq ID nº de dsRNA	Média	Maior pontuação
14	324	42,9	42,9
2	316	60,0	60,0
4	318	65,0	80,0
24	327	42,9	42,9
1	315	29,5	60,0
11	328	66,7	66,7
17	322	35,7	35,7
9	329	33,3	33,3
23	330	41,7	41,7
7	323	86,3	100,0
10	331	50,0	50,0
8	332	57,6	71,4
3	317	89,0	100,0
6	320	75,7	80,0
20	333	71,5	92,9
21	325	42,9	42,9
12	321	28,6	28,6
5	319	53,3	80,0
18	334	31,3	62,5
16	326	35,7	35,7

[0208] Para testar ainda mais a eficácia do direcionamento de SEQ ID nºs 3 e 7, ambas direcionadas ao RNA proteassomal, a experiência acima descrita foi repetida usando uma combinação do dsRNA estabelecido nas SEQ ID nºs 3 e 7 (1 micrograma de cada um dos ds RNA 317 e 323). Como pôde ser visto na **Figura 2**, cerca de 50% das larvas foram encontradas mortas já após 7 dias de tratamento, cerca de 70% após 10 dias de tratamento e todas as larvas estavam mortas após 14 dias de tratamento.

[0209] Inesperadamente, como pôde ser visto na **Figura 4**, a porcentagem média de larvas mortas contadas 14 dias após a alimentação com dsRNA direcionado ao mRNA que codifica proteínas

proteassomais ou associadas ao proteassoma (SEQ ID nºs: 3, 7, 8, 10, 20 e 21) foi quase duas vezes a porcentagem média de morte celular obtida com direcionamento a proteínas não proteassomais (67,7% vs. 36,8%), e nenhum outro grupo de proteínas causou um grau semelhante de morte de larvas.

[0210] Consequentemente, o genoma de *Rhynchophorus ferrugineus* foi posteriormente analisado quanto a sequências com semelhança a proteínas proteassomais ou proteínas associadas ao proteassoma. Estas sequências-alvo incluem, por exemplo, SEQ ID nºs: 19, 26, 30, 47, 55, 57, 63 e 335 a 376. O dsRNA direcionado contra essas sequências é analisado quanto à sua capacidade de causar a morte de larvas de *Rhynchophorus ferrugineus*, conforme descrito essencialmente acima.

[0211] Para determinar a concentração ideal, a porcentagem de morte de larvas obtida usando diferentes concentrações do dsRNA estabelecido na SEQ ID nº 317 também foi testada. Como pôde ser visto na **Figura 3** todas as larvas foram encontradas mortas 14 dias após a alimentação, usando apenas 0,5 microgramas do dsRNA.

EXEMPLO 3 - INJEÇÃO DE dsRNA EM PALMEIRAS

ÁRVORES

[0212] As palmeiras (*Phoenix dactylifera*, cultivar *Majhool*) foram cultivadas até aproximadamente 1,5 a 2 metros de altura. A injeção foi realizada através de um orifício na base da árvore feito por uma broca; três árvores foram testadas.

INJEÇÃO

[0213] 10 ml de solução de dsRNA (dsRNA dissolvido em água esterilizada) do RNA alvo estabelecido na SEQ ID nº: 3 (SEQ ID nº: 317) em uma concentração final de 10 µg por 1 ml foram injetados na base da árvore. 4 ou 8 dias após a injeção, uma amostra de folha, localizada ~ 0,4 a 0,6 metros acima do ponto de injeção, foi retirada.

DETECÇÃO DE RNA

[0214] O ddH₂O esterilizado foi transferido à força (~ 250 µl) para uma extremidade do pecíolo (base da folha) e foi coletado do outro lado em um tubo de 1,5. 10 µl da solução coletada usada como molde para RT PCR (Máxima) com um iniciador específico para o dsRNA estabelecido na SEQ ID nº: 317, seguido por uma reação de PCR usando 2 iniciadores únicos.

RESULTADOS

[0215] Como pode ser visto na **Figura 5**, o dsRNA correspondente à SEQ ID nº: 3 foi encontrado na base das folhas de todas as árvores testadas (indicado por 1, 2 e 3, respectivamente, NC1 é um controle negativo), indicando assim que o dsRNA injetado na base de das árvores espalha-se pelo caule e pelas folhas.

EXEMPLO 4 - ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS COM CAULE OU CASCA OBTIDA DE ÁRVORE INJETADA COM dsRNA

[0216] Palmeiras (*Phoenix dactylifera*, cultivar *Majhool*) são injetadas com dsRNA direcionado a um ou mais mRNAs essenciais do bicudo-vermelho-das-palmeiras, ou uma composição compreendendo o mesmo, como essencialmente descrito acima.

[0217] A casca é coletada conforme descrito acima.

[0218] Larvas de 1 a 2,5 cm são cultivadas em um recipiente de plástico em forma de xícara e alimentadas com a casca (opcionalmente esmagada ou triturada).

[0219] Os recipientes são então colocados em um local úmido escuro a uma temperatura de 25 a 30 °C. A viabilidade e mudança na mobilidade das larvas é avaliada 4 vezes, durante 14 dias após o tratamento.

EXEMPLO 5 - PREVENÇÃO DA INFESTAÇÃO DE PALMEIRAS COM BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS POR INJEÇÃO DE dsRNA

[0220] Palmeiras (*Phoenix dactylifera*, cultivar *Majhool*) são injetadas com dsRNA direcionado a um ou mais mRNAs essenciais

do bicudo-vermelho-das-palmeiras, ou uma composição compreendendo o mesmo, como essencialmente descrito acima.

[0221] As árvores são então infestadas com larvas e/ou bicudos-vermelhos-das-palmeiras adultos.

[0222] As árvores são monitoradas quanto à infestação por meio da avaliação de larvas mortas ou vivas.

EXEMPLO 6 - PREVENÇÃO DA INFESTAÇÃO DE PALMEIRAS COM BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS PELO FORNECIMENTO DE dsRNA AO SOLO

[0223] O dsRNA direcionado a um ou mais mRNAs essenciais do bicudo-vermelho-das-palmeiras, ou uma composição compreendendo os mesmos, é pulverizado ou de outra forma fornecido ao solo de plantação de palmeiras (*Phoenix dactylifera*, cultivar *Majhool*).

[0224] As árvores são então infestadas com larvas e/ou bicudos-vermelhos-das-palmeiras adultos.

[0225] As árvores são monitoradas quanto à infestação por meio da avaliação de larvas mortas ou vivas.

EXEMPLO 7 - TRATAMENTO DE INFESTAÇÃO DO BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS POR INJEÇÃO DE dsRNA A PALMEIRAS

[0226] As palmeiras são infestadas com larvas e/ou bicudos-vermelhos-das-palmeiras adultos.

[0227] Após a comprovação da infestação (entre 0 a 2 meses), as palmeiras (*Phoenix dactylifera*, cultivar *Majhool*) são injetadas com um dsRNA direcionado a um ou mais mRNAs essenciais do bicudo-vermelho-das-palmeiras, ou uma composição compreendendo o mesmo, como essencialmente descrito acima.

[0228] As árvores são monitoradas quanto à severidade da infestação avaliando larvas mortas e vivas 3 meses após o tratamento.

EXEMPLO 8 - TRATAMENTO DE INFESTAÇÃO DO
BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS PELO FORNECIMENTO DE dsRNA
AO SOLO DA PALMEIRA

[0229] As palmeiras são infestadas com larvas e/ou bicudos-vermelhos-das-palmeiras adultos.

[0230] Após a comprovação da infestação (entre 0 a 2 meses), uma composição compreendendo dsRNA direcionado a um ou mais mRNAs essenciais do bicudo-vermelho-das-palmeiras, ou uma composição compreendendo o mesmo, é fornecida ao solo das palmeiras (*Phoenix dactylifera*, cultivar *Majhool*).

[0231] As árvores são monitoradas quanto à severidade da infestação avaliando larvas mortas e vivas 3 meses após o tratamento.

EXEMPLO 9 - TRATAMENTO DE INFESTAÇÃO DO
BICUDO-VERMELHO-DAS-PALMEIRAS PELO FORNECIMENTO DE dsRNA
AO BROTO OU COPA DE PALMEIRA

[0232] As palmeiras são infestadas com larvas e/ou bicudos-vermelhos-das-palmeiras adultos.

[0233] Após a comprovação da infestação (entre 0 a 2 meses), uma composição compreendendo dsRNA direcionado a um ou mais mRNAs essenciais do bicudo-vermelho-das-palmeiras, ou uma composição compreendendo o mesmo, é fornecida para a parte superior do broto das palmeiras ou da copa da árvore (*Phoenix dactylifera*, cultivar *Majhool*).

[0234] As árvores são monitoradas quanto à severidade da infestação avaliando larvas mortas e vivas 3 meses após o tratamento.

[0235] Embora certas modalidades da invenção tenham sido ilustradas e descritas, será claro que a invenção não está limitada às modalidades descritas neste documento. Numerosas modificações, mudanças, variações, substituições e equivalentes serão evidentes para aqueles

versados na técnica sem se afastar do espírito e do escopo da presente invenção conforme descrito pelas reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. dsRNA para controlar a infestação de uma planta com bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*), o dsRNA **caracterizado** pelo fato de que compreende uma sequência de polinucleotídeos que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras, em que a ingestão do dito polinucleotídeo do dsRNA pelo dito bicudo-vermelho-das-palmeiras resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento do mesmo.

2. dsRNA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o gene alvo é um gene relacionado ao proteassoma.

3. dsRNA, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o gene alvo tem uma sequência de codificação selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID N° 3, 6, 7, 8, 10, 19, 20, 21, 26, 30, 47, 55, 57, 63, 96, 121, 124, 125, 252, 272 e 235-376.

4. dsRNA, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o gene alvo tem uma sequência de codificação selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID N°: 3, 6, 7, 8, 10, 20, 21 e 26.

5. dsRNA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o gene alvo tem uma sequência de codificação selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID N°: 1 a 314 e 335 a 376.

6. dsRNA, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o gene alvo tem uma sequência de codificação selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID N°: 1 a 26.

7. dsRNA, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o gene alvo tem uma sequência de codificação selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID N°: 1 a 12, 14, 16 a 18, 20, 21, 24, 26, 335, 341 a 343, 346 a 348, 352 a 355, 359, 361, 362, 367 e 371 a 374.

8. dsRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de que o dsRNA compreende pelo menos 140 pb.

9. dsRNA, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o dsRNA compreende pelo menos 200 pb.

10. dsRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que o dsRNA compreende uma sequência de polinucleotídeos que é cerca de 95% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

11. dsRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que a planta é uma palmeira da família *Arecaceae*.

12. Célula de planta **caracterizada** pelo fato de que tem estavelmente incorporada em seu genoma uma sequência de nucleotídeos que codifica o dsRNA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

13. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende a construção de dsRNA como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizada** pelo fato de que a composição está na forma de um sólido, líquido, pó, suspensão, emulsão, spray, encapsulamento, microesferas, partículas carreadoras, película, matriz, umidificador de solo ou tratamento de sementes.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 13 ou 14, **caracterizada** pelo fato de que a composição compreende nanopartículas e/ou lipossomas que incorporam o dsRNA.

16. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 15, **caracterizada** pelo fato de que compreende adicionalmente um ou mais componentes selecionados do grupo que consiste em um agente carreador, um tensoativo, um organossilicone, uma molécula herbicida polinucleotídica, uma molécula herbicida não polinucleotídica, um pesticida não polinucleotídico, um fungicida, um protetor, um fertilizante, um micronutriente, um atrativo de insetos e um regulador de crescimento de insetos.

17. Construção de DNA recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende um promotor heterólogo operacionalmente ligado a uma sequência

que codifica o dsRNA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

18. Bactéria **caracterizada** pelo fato de que tem integrada de forma estável em seu genoma uma sequência que codifica o dsRNA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

19. Vírus **caracterizado** pelo fato de que tem integrada de forma estável em seu genoma uma sequência que codifica o dsRNA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

20. Método para prevenir, melhorar e/ou tratar a infestação de uma planta com bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*), o método **caracterizado** pelo fato de que compreende fornecer à planta o dsRNA conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o fornecimento do dsRNA à planta compreende aplicar o dsRNA ou uma composição compreendendo o mesmo na planta; injetar o dsRNA ou uma composição compreendendo o mesmo na planta; pulverizar o dsRNA ou uma composição compreendendo o mesmo na ou sobre a planta; distribuir a composição à planta por absorção através do solo; colocar uma fonte de alimentação compreendendo o dsRNA na proximidade da planta ou do bicudo-vermelho-das-palmeiras; expressar o dsRNA de maneira endógena na planta, aplicando uma composição compreendendo bactérias e/ou vírus que expressam o dsRNA na planta ou qualquer combinação dos mesmos.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que o fornecimento do dsRNA à planta compreende injetar o dsRNA ou uma composição compreendendo o mesmo em uma base da planta.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, **caracterizado** pelo fato de que o bicudo-vermelho-das-palmeiras é uma larva do bicudo-vermelho-das-palmeiras.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, **caracterizado** pelo fato de que a planta é uma palmeira da família *Arecaceae*.

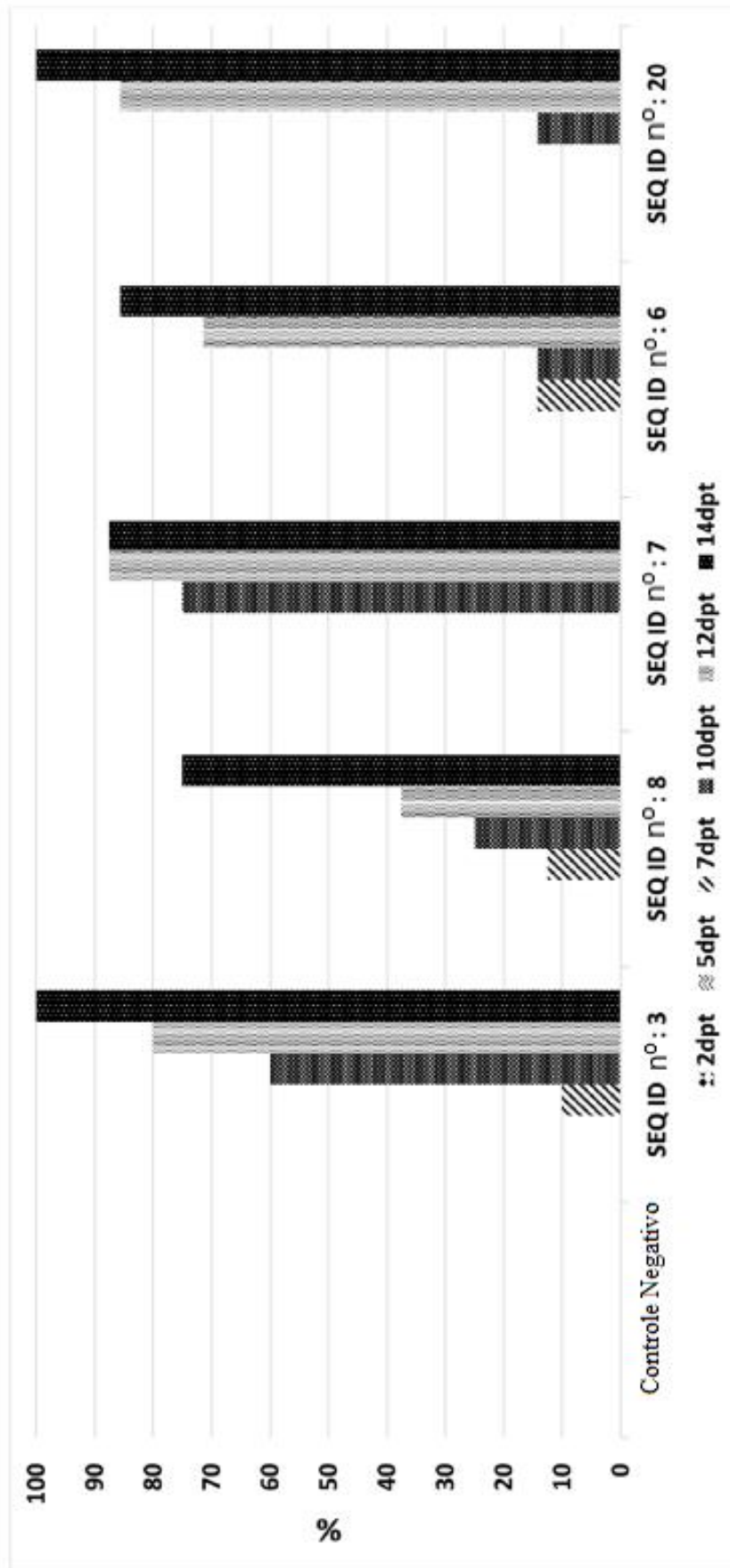


FIG. 1

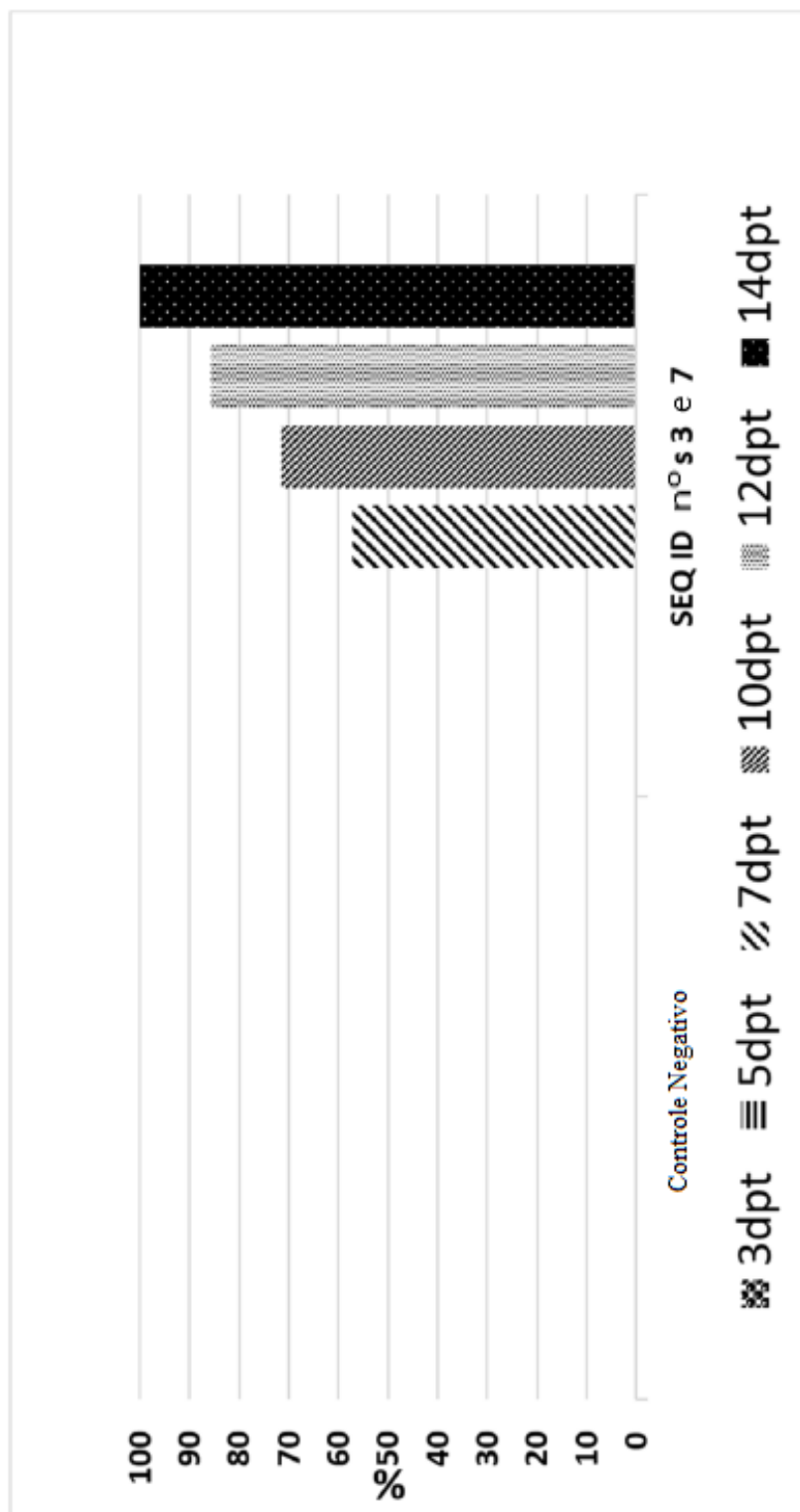


FIG. 2

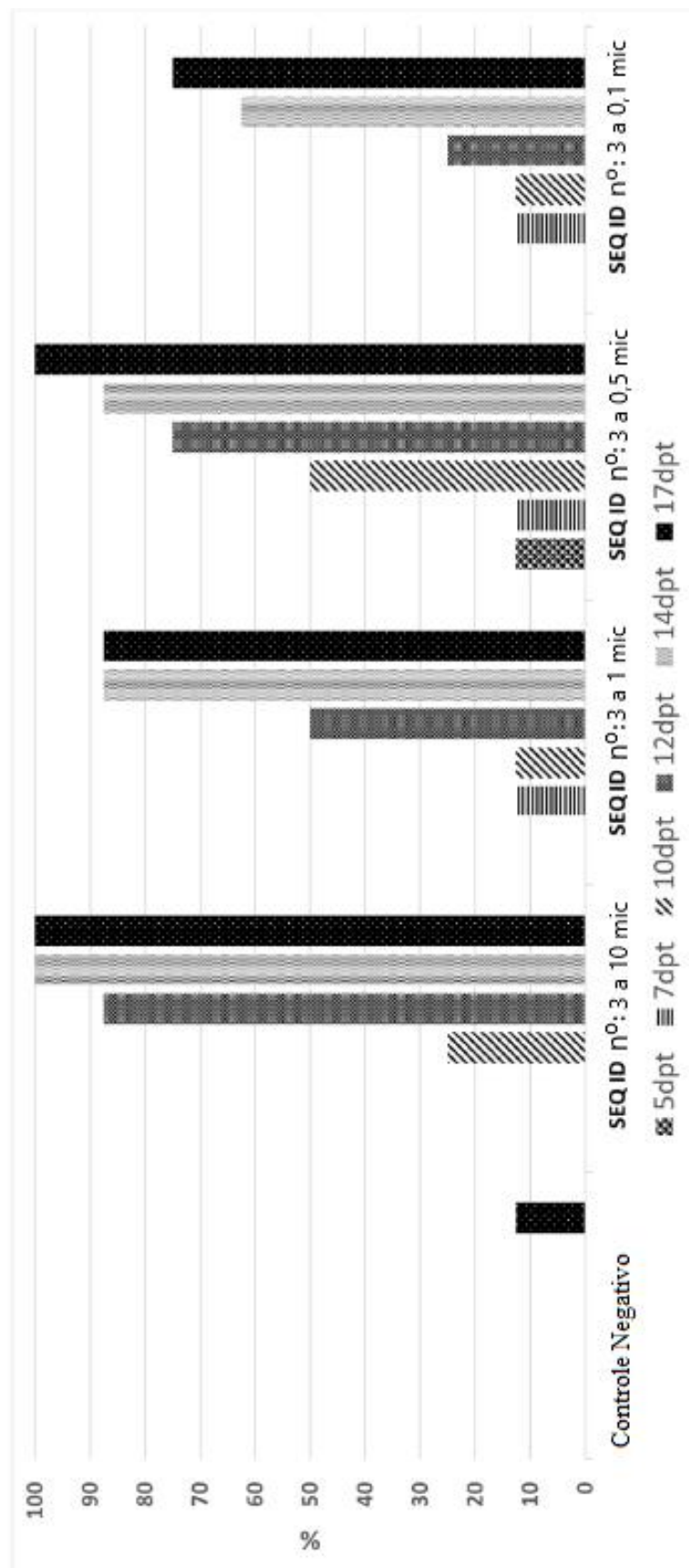


FIG. 3

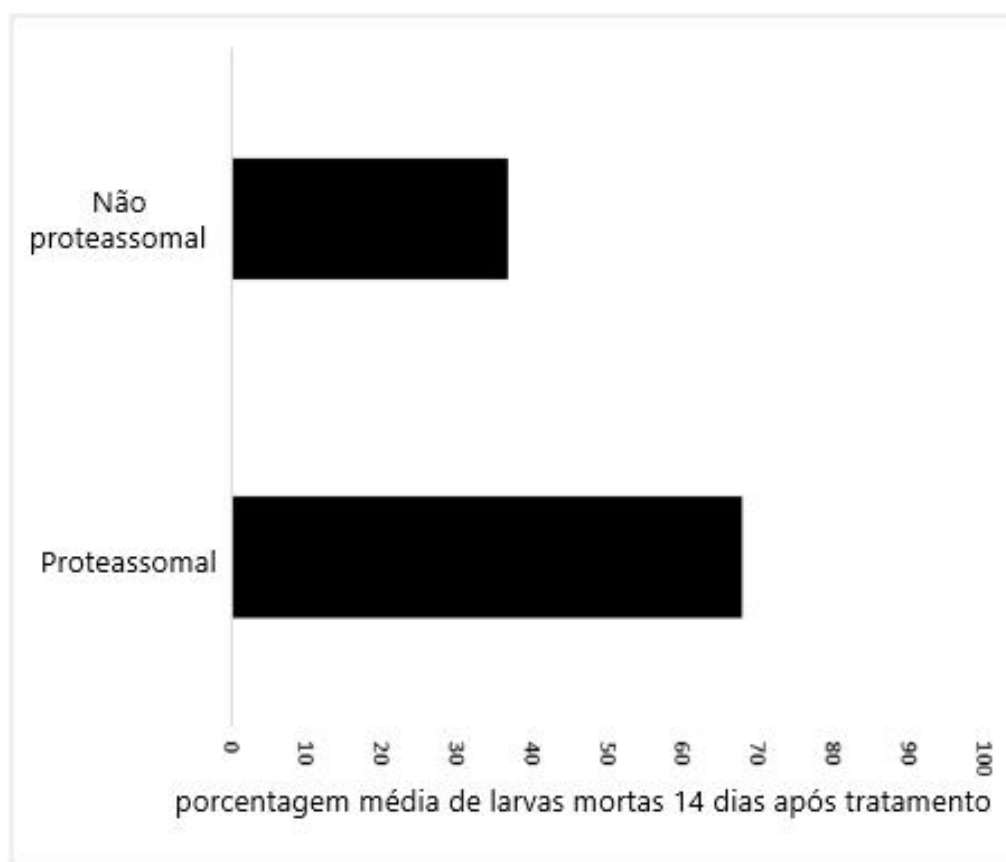


FIG. 4

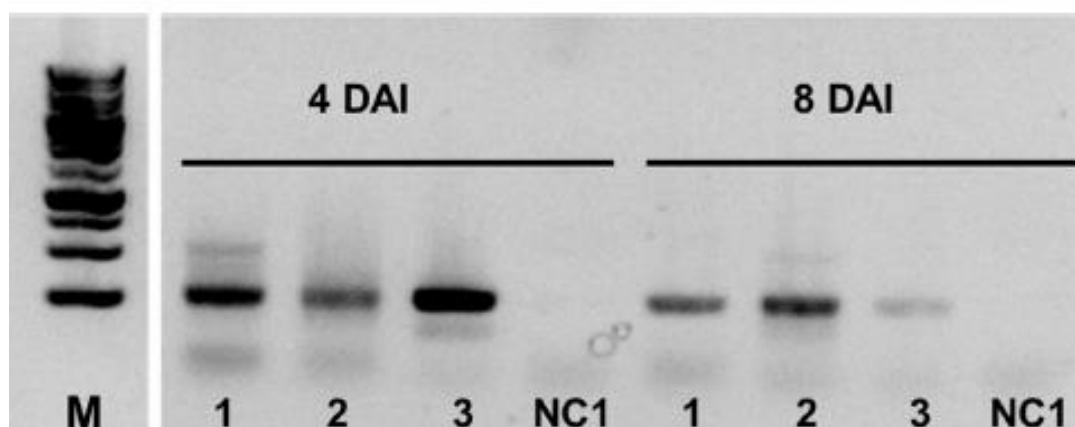


FIG. 5

COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MITIGAR A INFESTAÇÃO DE PESTES

dsRNA para prevenir, mitigar e/ou tratar a infestação de uma planta com bicudo-vermelho-das-palmeiras (*Rhynchophorus ferrugineus*), o dsRNA compreendendo uma sequência de polinucleotídeos que é cerca de 85% a cerca de 100% complementar a um segmento de um gene alvo do bicudo-vermelho-das-palmeiras, em que a ingestão do polinucleotídeo do dsRNA pelo bicudo-vermelho-das-palmeiras resulta em mortalidade e/ou retardo de crescimento do mesmo.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências M.38.154.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 11/03/2021
- Hora de Geração do Código: 16:54:12
- Código de Controle:
 - Campo 1: 0F8055943320B8F2
 - Campo 2: B5070AEFA48240BB