



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0720174-5 B1

(22) Data do Depósito: 04/12/2007

(45) Data de Concessão: 30/01/2018



(54) Título: PROCESSO PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA DE UMA PLANTA A INSETOS E SEUS USOS

(51) Int.Cl.: C12N 15/82; C12N 5/14; C12N 15/11; C07H 21/00; A01H 1/00

(30) Prioridade Unionista: 04/12/2006 CN 200610119029.7

(73) Titular(es): SHANGHAI INSTITUTES FOR BIOLOGICAL SCIENCES, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES

(72) Inventor(es): XIAOYA CHEN; YINGBO MAO; ZHIPING LIN; LINGJIAN WANG

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"PROCESSO PARA AUMENTAR A RESISTÊNCIA DE UMA PLANTA
A INSETOS E SEUS USOS".**

Campo técnico

[001] A presente invenção refere-se à biotecnologia e à botânica, particularmente a presente invenção refere-se a novos métodos para modificar a resistência a insetos.

Antecedentes da invenção

[002] Na agricultura, o problema de insetos sempre foi um fator importante que influencia o produto agrícola. Muitos recursos humanos e de materiais são utilizados na inibição de pragas de insetos e na melhoria da produção.

[003] Devido ao aumento da resistência aos pesticidas e pela consideração da proteção ambiental e do desenvolvimento sustentável, é necessário com urgência um novo método para resistência a insetos. A invenção de planta transgênica resistente a insetos aliviou esta pressão e produziu grande contribuição à agricultura, tal como a soja transgênica resistente a insetos, o algodão resistente a insetos Bt etc. Entretanto, há muitos relatos na pesquisa de que a resistência de várias plantas transgênicas resistentes a insetos diminuía com o tempo, a praga de inseto que era raramente observada anteriormente ocorria novamente.

[004] Portanto, é necessário com urgência descobrir um novo método e desenvolver uma nova planta transgênica resistente a insetos para resistir eficiente e/ou especificamente à praga de inseto.

Sumário da invenção

[005] A presente invenção tem o objetivo de fornecer métodos para a modificação da resistência de plantas a insetos através da utilização da técnica de RNAi.

[006] O primeiro aspecto da invenção refere-se a métodos para

aumentar a resistência de plantas a insetos, que compreendem as etapas a seguir:

[007] Transfecção das construções que expressam dsRNAs do gene de inseto em células, tecidos ou órgãos vegetais, em que as ditas construções que expressam os dsRNAs do gene de inseto são de fita dupla e suas fitas senso ou fitas antissenso contêm a estrutura a seguir como a Fórmula I:

$Seq_{\text{senso}}\text{-X-}Seq_{\text{antissenso}}$ Fórmula I

[008] Em que,

Seq_{senso} é uma sequência senso ou um fragmento de um gene de inseto, em que o dito segmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

$Seq_{\text{antissenso}}$ é uma sequência ou um fragmento complementar à Seq_{senso} , em que o dito segmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

X é uma sequência interveniente entre Seq_{senso} e $Seq_{\text{antissenso}}$ e a dita sequência interveniente não é complementar à Seq_{senso} ou à $Seq_{\text{antissenso}}$.

[009] Em uma outra modalidade preferida, os ditos dsRNAs formam RNAs interferentes em plantas.

[0010] Em uma outra modalidade preferida, a dita resistência a insetos é resistir a insetos que se alimentam de plantas.

[0011] Em uma outra modalidade preferida, as ditas construções estão nos vetores de expressão e os ditos vetores de expressão também contêm promotores que podem ativar a transcrição em plantas.

[0012] Em uma outra modalidade preferida, os ditos genes de insetos são necessários para o crescimento dos insetos ou os genes que podem influenciar o crescimento ou o desenvolvimento dos insetos sob condições específicas (por exemplo, na presença de ou

induzidos por pesticida ou fitoalexina).

[0013] Em uma outra modalidade preferida, os ditos genes de insetos são expressos no estômago ou nos intestinos dos insetos. Preferencialmente, os ditos genes de insetos são específicos ou altamente expressos no estômago ou nos intestinos dos insetos.

[0014] Em uma outra modalidade preferida, as ditas plantas são selecionadas de dicotiledôneas, monocotiledôneas ou gimnospermas.

[0015] Em uma outra modalidade preferida, as ditas plantas são plantas de cultivo, flores ou plantas florestais.

[0016] Em uma outra modalidade preferida, as ditas plantas incluem, mas não estão limitadas a algodão, tabaco, *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, milho, sorgo e outras.

[0017] Em uma outra modalidade preferida, os ditos insetos são selecionados daqueles que se alimentam de plantas.

[0018] Em uma outra modalidade preferida, os ditos insetos incluem, mas não estão limitados à lagarta que ataca o algodoeiro.

[0019] Em uma outra modalidade preferida, as ditas sequências intervenientes possuem 80-300 pb de comprimento, preferencialmente 100-250 pb.

[0020] Em uma outra modalidade preferida, as ditas sequências intervenientes são íntrons.

[0021] O segundo aspecto da invenção refere-se ao uso de dsRNAs do gene de inseto para a produção de plantas resistentes a insetos.

[0022] Em uma outra modalidade preferida, o dito gene é o gene GIP da lagarta que ataca o algodoeiro.

[0023] Em uma outra modalidade preferida, os ditos genes de insetos podem ser incorporados em uma construção de fita dupla e suas fitas senso ou fitas antissenso contêm a estrutura a seguir como a Fórmula I:

$\text{Seq}_{\text{sensso}}\text{-X-Seq}_{\text{antissenso}}$ Fórmula I

[0024] Em que,

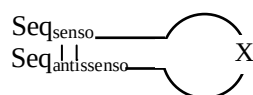
$\text{Seq}_{\text{sensso}}$ é uma sequência senso ou um fragmento de um gene de inseto, em que o dito segmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

$\text{Seq}_{\text{antissenso}}$ é uma sequência ou um fragmento complementar à $\text{Seq}_{\text{sensso}}$, em que o dito segmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

X é uma sequência interveniente entre $\text{Seq}_{\text{sensso}}$ e $\text{Seq}_{\text{antissenso}}$ e a dita sequência interveniente não é complementar à $\text{Seq}_{\text{sensso}}$ ou à $\text{Seq}_{\text{antissenso}}$.

[0025] Em uma outra modalidade preferida, após as construções que expressam os dsRNAs do gene de inseto serem transfectadas em células, tecidos ou órgãos vegetais, os dsRNAs do gene de inseto mostrados na Fórmula II são formados nas células, nos tecidos ou nos órgãos vegetais,

Fórmula II



Em que,

$\text{Seq}_{\text{sensso}}$, $\text{Seq}_{\text{antissenso}}$ e X são como definidos anteriormente,

|| significa que há pontes de hidrogênio formadas entre $\text{Seq}_{\text{sensso}}$ e $\text{Seq}_{\text{antissenso}}$.

[0026] O terceiro aspecto da invenção refere-se a células vegetais, as ditas células vegetais contendo construções que expressam os dsRNAs do gene de inseto, as ditas construções expressando os dsRNAs do gene de inseto são de fita dupla e suas fitas senso ou fitas antissenso contêm a estrutura a seguir como a Fórmula I:

$\text{Seq}_{\text{sensso}}\text{-X-Seq}_{\text{antissenso}}$ Fórmula I

[0027] Em que,

$\text{Seq}_{\text{sensso}}$ é uma sequência senso ou um fragmento de gene de inseto, em que o dito segmento possui pelo menos 50 pb de

comprimento;

Seq_{antissenso} é uma sequência ou um fragmento complementar à Seq_{senso}, em que o dito segmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

X é uma sequência interveniente entre Seq_{senso} e Seq_{antissenso} e a dita sequência interveniente não é complementar à Seq_{senso} ou à Seq_{antissenso}.

[0028] O quarto aspecto da invenção refere-se a uma proteína GIP isolada, que é seleccionada do grupo a seguir:

(a) um polipeptídeo com a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2; ou

(b) um polipeptídeo com uma sequência de aminoácidos que compartilha pelo menos 70% de homologia com a da SEQ ID NO: 2 e que possui as mesmas funções que as do polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2.

[0029] O quinto aspecto da invenção refere-se a um polinucleotídeo isolado, que é seleccionado do grupo a seguir:

(a) uma sequência de nucleotídeos que possui a sequência da SEQ ID NO: 1; ou

(b) uma sequência de nucleotídeos que pode se hibridizar com a SEQ ID NO: 1 sob condições de hibridização estridentes; ou

(c) uma sequência de nucleotídeos que compartilha pelo menos 70% de identidade com a da SEQ ID NO: 1; ou

(d) um fragmento de nucleotídeo que possui uma sequência que contém não menos que 50 nucleotídeos contíguos da SEQ ID NO: 1 e o fragmento pode silenciar o gene GIP; ou

(e) uma sequência de nucleotídeos que é complementar às sequências em (a), (b), (c) ou (d).

[0030] O sexto aspecto da invenção refere-se ao uso dos nucleotídeos descritos anteriormente para a produção de preparações

ou plantas que são capazes de inibir o crescimento de insetos.

[0031] Em uma outra modalidade preferida, as ditas preparações ou plantas contêm dsRNAs que podem silenciar o gene GIP.

[0032] Em uma outra modalidade preferida, os ditos dsRNAs contêm a estrutura a seguir como a Fórmula I:

Seq₁-X-Seq₂ Fórmula I

[0033] Em que,

Seq₁ é uma sequência ou um fragmento do gene GIP, em que o dito fragmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

Seq₂ é uma sequência de nucleotídeos ou um fragmento complementar à Seq₁, em que o dito fragmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

X é uma sequência interveniente entre Seq₁ e Seq₂ e a dita sequência interveniente não é complementar à Seq₁ ou à Seq₂.

[0034] Em uma outra modalidade preferida, o dito inseto é a lagarta que ataca o algodoeiro.

[0035] O sétimo aspecto da invenção refere-se a métodos para aumentar a estabilidade de dsRNAs com não menos que 50 nucleotídeos, caracterizados por: transfecção dos ditos dsRNAs em células, tecidos ou órgãos hospedeiros que são sem uma nuclease do tipo dicer ou com uma nuclease do tipo a dicer inativa.

[0036] Em uma outra modalidade preferida, os ditos hospedeiros são eucariotos ou procariotos.

[0037] O oitavo aspecto da invenção refere-se ao uso do gene GIP para a produção de preparações ou de plantas que são capazes de inibir o crescimento da lagarta que ataca o algodoeiro.

[0038] Em uma outra modalidade preferida da invenção, as ditas preparações para a inibição do crescimento da lagarta que ataca o algodoeiro podem conter RNAs interferentes (tais como siRNAs) para a regulação para menos da expressão do gene GIP.

[0039] Em uma outra modalidade preferida da invenção, as ditas preparações podem regular para menos a expressão do gene GIP na lagarta que ataca o algodoeiro.

[0040] Em uma outra modalidade preferida da invenção, as ditas preparações podem regular para menos a expressão do gene GIP na lagarta que ataca o algodoeiro através da inibição da transcrição do gene GIP.

[0041] Em uma outra modalidade preferida da invenção, as ditas preparações podem inibir o crescimento da lagarta que ataca o algodoeiro através da redução da resistência da lagarta que ataca o algodoeiro ao gossipol.

[0042] Em uma outra modalidade preferida da invenção, o dito gene GIP contém a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1.

[0043] As condições de hibridização estringentes na invenção referem-se à hibridização a 50°C durante 6-16 h, à lavagem da membrana a 42°C durante 30 min e a solução de lavagem é 5XSSC com 50% de formamida.

[0044] Em vista da presente descrição, outros aspectos da invenção podem ser facilmente considerados pelos versados na técnica.

Descrição das figuras

[0045] A Figura 1 mostra um esquema que ilustra a expressão dos dsRNAs derivados de genes de insetos em plantas e a inibição subsequente da expressão dos genes relacionados nos insetos que se alimentaram das plantas.

[0046] A Figura 2 mostra as sequências de nucleotídeos e as sequências de proteínas deduzidas de *GIP* e *GST1*, em que, A: a sequência de nucleotídeos de *GIP*; B: a sequência de proteína de *GIP*; C: a sequência de nucleotídeos de *GST1*; D: a sequência de proteína de *GST1*. As sequências utilizadas para a construção de vetores

dsRNA em modalidades preferidas da invenção estão sombreadas.

ATG: códon de início; TAA: códon de término.

[0047] A Figura 3 mostra que, na presença de gossipol, a expressão de GIP se correlaciona intimamente com o crescimento da lagarta que ataca o algodoeiro.

[0048] A Figura 4A mostra a construção de um vetor de dsRNA de acordo com uma modalidade da invenção. A Figura 4A (parte superior) mostra uma estrutura parcial do vetor PBI121. A Figura 4A (inferior) mostra uma estrutura parcial de PBIdsRNA construído com o vetor PBI121.

[0049] A Figura 4B mostra a expressão de tabaco e *Arabidopsis thaliana* transgênicos transfetados com dsRNA com a sequência de *GIP*, *GFP* ou *GST1* através do ensaio de Northern blot.

[0050] A Figura 5 mostra os efeitos sobre a lagarta que ataca o algodoeiro causados pela expressão do dsRNA contendo a sequência de *GIP* em *Arabidopsis thaliana* e tabaco transgênicos.

[0051] A Figura 6 mostra os efeitos sobre a lagarta que ataca o algodoeiro causados pela expressão de dsRNA contendo a sequência de *GIP* no algodão.

[0052] A Figura 7 mostra o efeito sobre a lagarta que ataca o algodoeiro causado pela expressão de dsRNA contendo a sequência de *GST1* em *Arabidopsis thaliana*.

[0053] A Figura 8 mostra a inibição da expressão de *GIP* no mesentério das lagartas que atacam o algodoeiro, que ingeriram uma planta contendo construções com as mutações triplas *dcl2 dcl3 dcl4* correspondendo à sequência de dsGIP.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA MODALIDADE PREFERIDA

[0054] Após pesquisa extensiva e meticulosa, os inventores descobriram de forma inesperada que o RNA interferente (tal como siRNA) do gene de inseto formado em plantas pode inibir

significativamente o gene de inseto após a ingestão. Esta inibição é dificilmente ou de forma alguma afetada pelos sistemas digestivos do inseto. Assim, as plantas transgênicas que expressam o RNA interferente de genes de inseto podem ser utilizadas para interferir ou para inibir a expressão de genes alvos em insetos que se alimentam de plantas através da interferência de RNA após a ingestão das plantas por tais insetos.

[0055] Assim, os inventores desenvolvem métodos para a inibição do crescimento de insetos através da utilização do mecanismo de interferência de RNA utilizando plantas como veículos. Isto é, introduzindo construções que contêm sequências do gene do inseto (ou fragmentos) nas plantas, as construções nas plantas podem expressar dsRNAs de genes de insetos, que formam RNAs interferentes (tais como siRNA). Os insetos que se alimentam de tais plantas iriam ingerir os RNAs interferentes, o que poderia inibir as expressões de genes nos insetos. Como um resultado, os crescimentos dos insetos podem ser inibidos.

[0056] Além disso, os inventores também descobriram, na lagarta que ataca o algodoeiro, que um gene desempenha uma função significativa na desintoxicação do gossipol. O gene de comprimento completo é isolado de uma biblioteca de cDNA de *Helicoverpa armigera* e chamado de *GIP* pelos inventores. Estudos adicionais mostram que a inibição da expressão do gene GIP pode inibir significativamente o crescimento da lagarta que ataca o algodoeiro e reduzir a resistência da lagarta que ataca o algodoeiro ao gossipol.

Interferência de RNA (RNAi)

[0057] O termo "interferência de RNA" (RNAi) refere-se aqui a certos RNA de fita dupla que podem bloquear a expressão de certos genes com alta eficiência e especificidade e facilitar a degradação do mRNA. As células podem exibir um fenótipo específico resultante de

genes específicos que serão nocauteados. Este processo é também referido como intervenção de RNA.

[0058] O termo "RNA interferente" refere-se a moléculas de RNA de fita dupla, que podem degradar o mRNA alvo através da hibridização com as sequências complementares no mRNA alvo. Este processo é referido como via de interferência de RNA.

[0059] Na invenção, o princípio básico da interferência de RNA é como a seguir: utilização de plantas como intermediário, permitir que os insetos ingiram os RNAs interferentes (tal como siRNA) que podem interferir com as expressões dos genes do inseto (tal como o gene GIP), levando à inibição do crescimento do inseto. Em particular, o princípio é como a seguir: utilização dos métodos de transfecção gênica para expressar RNAs de fita dupla (dsRNAs) derivados de genes de inseto (de comprimento completo ou parte de genes) em plantas para produzir altos níveis de RNAs interferentes em plantas. Após os insetos terem ingerido tais plantas transgênicas, grandes quantidades de RNAs interferentes são ingeridas. Os RNAs interferentes podem por sua vez inibir a expressão de genes de insetos resultando na inibição de crescimentos/desenvolvimentos normais dos insetos ou até mesmo na morte e, assim, atingindo a meta de reduzir danos nas plantas causados por insetos. Como mostrado na Figura 1, Dicer é RNAase III nuclelease; RISC é o complexo de silenciamento induzido por RNA, "interferente" significa uma sequência interferente. Com base neste princípio, é possível aumentar eficientemente a resistência das plantas aos insetos.

[0060] De acordo com as modalidades preferidas da invenção, uma sequência de íntron é conectada, em suas duas extremidades, às sequências complementares para formar uma estrutura de "haste-alça" após a transfecção nas células. A "haste" pode ser processada pelas plantas para se tornar pequenos RNAs de aproximadamente 21-25 nt,

que podem inibir eficientemente a expressão de genes alvos.

[0061] A utilização de técnicas de interferência de RNA para a produção de novas plantas transgênicas com resistência a insetos pode ter impacto significativo sobre o desenvolvimento da agricultura.

[0062] Métodos para aumentar a resistência a insetos em plantas

[0063] Com base no princípio da interferência de RNA, as modalidades da presente invenção fornecem métodos para o aumento da resistência a insetos em plantas. Um método de acordo com uma modalidade da invenção inclui: a transfecção de uma construção que expressa um dsRNA de gene de inseto em células, tecidos ou órgãos vegetais, em que a dita construção que expressa o dsRNA de gene de inseto é de fita dupla, cuja fita senso ou a fita antissenso contém a estrutura a seguir:

$$\text{Seq}_{\text{senso}}\text{-X-Seq}_{\text{antissenso}} \quad \text{Fórmula I}$$

Em que,

$\text{Seq}_{\text{senso}}$ é uma sequência senso de um gene de inseto ou um fragmento do mesmo, em que o dito fragmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

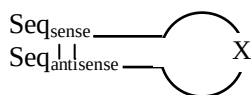
$\text{Seq}_{\text{antissenso}}$ é uma sequência antissenso do mesmo gene de inseto ou um fragmento do mesmo, em que o dito segmento possui pelo menos 50 pb de comprimento;

X é uma sequência interveniente entre $\text{Seq}_{\text{senso}}$ e $\text{Seq}_{\text{antissenso}}$ e a dita sequência interveniente não é complementar à $\text{Seq}_{\text{senso}}$ ou à $\text{Seq}_{\text{antissenso}}$.

[0064] De acordo com uma modalidade preferida, após as construções que expressam o dsRNA de gene de inseto serem transfectadas em células, tecidos ou órgãos vegetais, são expressas nas células, nos tecidos ou nos órgãos vegetais. O dsRNA expresso de gene de inseto forma uma estrutura mostrada na Fórmula II:

Fórmula II

Na qual,



Seq_{sense} , $Seq_{\text{antissense}}$ e X são como definidos anteriormente, || significa pontes de hidrogênio formadas entre a fita dupla de Seq_{sense} e $Seq_{\text{antissense}}$.

[0065] As modalidades da invenção não estão limitadas a genes de insetos específicos. Para afetar os insetos após seu consumo de plantas, os genes alvos de insetos são geralmente genes necessários para o crescimento ou aqueles necessários para o crescimento e para o desenvolvimento sob condições específicas. Aqui "genes necessários para o crescimento dos insetos" referem-se aqueles que desempenham funções importantes no crescimento, no desenvolvimento, no metabolismo ou na reprodução (também referidos como "genes importantes para o crescimento dos insetos"). A baixa expressão ou a ausência de expressão destes genes pode levar à anormalidade no crescimento, no desenvolvimento, no metabolismo ou na reprodução ou até mesmo à morte, nos insetos. Para uso na modalidade da invenção, os genes necessários para o crescimento dos insetos podem ser genes de comprimento completo ou fragmentos de genes. As condições específicas podem ser aquelas na presença de pesticida ou de fitoalexina. Devido ao fato de que os insetos ingerem oralmente o RNA interferente, os genes alvos de insetos são preferencialmente os expressos em altos níveis no estômago ou nos intestinos. A seleção de genes que são expressos no estômago ou nos intestinos pode, até alguma extensão, evitar problemas associados com barreiras ou degradação, que podem ser encontrados através da utilização da interferência de RNA para os genes alvos em outros tecidos ou órgãos nos insetos.

[0066] De acordo com as modalidades preferidas da invenção, os genes de inseto podem ser selecionados de (mas não estão limitados

a): gene P450 (*GIP*) ou gene da glutathione-S-transferase (*GST1*).

[0067] De acordo com as modalidades preferidas da invenção, os comprimentos de fragmentos de genes de inseto são pelo menos 50 pb de comprimento, por exemplo, 60 pb, 80 pb, 100 pb, 200 pb, 500 pb, 1000 pb genes de comprimento completo.

[0068] De acordo com as modalidades da invenção, as sequências interferentes não estão limitadas a quaisquer comprimentos específicos. Preferencialmente, as sequências interferentes e Seq_{senso} e Seq_{antisense} podem formar dsRNA da Fórmula II após serem introduzidas nas células ou no corpo. Preferencialmente, a sequência interferente possui 80-300 pb de comprimento, mais preferencialmente 100-250 pb de comprimento.

[0069] De acordo com as modalidades da invenção, as construções que expressam dsRNA de gene de inseto podem ser introduzidas em células, tecidos ou órgãos vegetais. Estas células, tecidos ou órgãos vegetais podem ser utilizados para produzir plantas, em que o dsRNA de gene de inseto é expresso nas plantas. O dsRNA forma RNA interferente (por exemplo, siRNA ou outras formas).

[0070] Geralmente, as construções mencionadas anteriormente se baseiam em vetores de expressão. Os vetores de expressão geralmente contêm promotores, origens de replicação e/ou genes marcadores. Um versado comum na técnica saberia como construir os vetores de expressão descritos na invenção. Estes métodos incluem a recombinação de DNA *in vitro*, a síntese de DNA, a recombinação *in vivo* e outras. Os vetores de expressão contêm preferencialmente um ou mais genes marcadores de seleção para a separação de células hospedeiras que possuem fenótipos de transformação, tal como resistência à canamicina, à gentamicina, à higromicina ou à ampicilina.

[0071] Os vetores de expressão que carregam as sequências gênicas apropriadas descritas anteriormente e os promotores ou as

sequências de controle apropriadas podem ser utilizados para transformar células hospedeiras apropriadas. As células hospedeiras de acordo com uma modalidade da invenção podem ser qualquer uma que seja adequada para carregar os vetores de expressão e para a transferência dos vetores de expressão para as células vegetais. Preferencialmente, a célula hospedeira é uma agrobactéria.

[0072] Embora os insetos descritos nos exemplos a seguir sejam lagartas que atacam o algodoeiro, deve ser entendido que as modalidades da invenção não estão limitadas a quaisquer insetos específicos. Ao invés disso, os insetos de acordo com as modalidades da invenção podem ser quaisquer insetos que se alimentam de plantas, tais como insetos lepidópteros.

[0073] As modalidades da invenção não estão limitadas a quaisquer plantas específicas, contanto que a transfecção gênica possa ser realizada com as plantas, tais como várias plantas de cultivo, flores ou plantas florestais e outras. As plantas podem ser (mas não estão limitadas a) dicotiledôneas, monocotiledôneas ou gimnospermas.

[0074] Mais especificamente, as plantas incluem (mas não estão limitadas a): algodão, tabaco, *Arabidopsis thaliana*, arroz, trigo, milho, sorgo e outros.

Gene *GIP*

[0075] De acordo com uma modalidade da invenção, os inventores utilizam o gene *GIP* para produzir plantas resistentes a insetos (plantas transgênicas).

[0076] O gene *GIP* é expresso até altos níveis no mesentério de lagartas que atacam o algodoeiro. O quadro aberto de leitura do gene contém 1578 bases (pb), que codificam 526 resíduos de aminoácidos. A Figura 2A mostra a sequência de DNA do gene (SEQ ID NO: 1) e a Figura 2B mostra a sequência de proteína (SEQ ID NO: 2).

[0077] A imuno-histoquímica e a análise de RT-PCR mostram que o *GIP* é altamente expresso no mesentério de lagartas que atacam o algodoeiro. O gene *GIP* pode ser especificamente induzido por compostos de gossipol adicionados externamente. Na presença de gossipol, os níveis de expressão de *GIP* exibem uma correlação positiva com os ganhos de peso nas lagartas que atacam o algodoeiro. Portanto, o *GIP* é um gene crítico para a desintoxicação do gossipol após as lagartas que atacam o algodoeiro consumirem plantas de algodão que contêm gossipol. Através da introdução do vetor de dsRNA contendo a sequência de *GIP* nas plantas, a transcrição do gene *GIP* nos tecidos intestinais é significativamente inibida, acompanhada por uma maior atividade da catalase, nas lagartas que atacam o algodoeiro que ingeriram as plantas transgênicas. Ao mesmo tempo, o crescimento das larvas é suprimido e a resistência ao gossipol é reduzida devido à regulação para menos do gene *GIP* no mesentério destas lagartas que atacam o algodoeiro.

[0078] De acordo com uma modalidade da invenção, os inventores utilizam o gene *GIP* para a construção de um vetor de expressão de dsRNA, para introduzir o vetor nas plantas, para produzir plantas transgênicas e para alimentar a lagarta que ataca o algodoeiro com as plantas transgênicas. Os resultados mostram que os crescimentos das lagartas que atacam o algodoeiro são significativamente inibidos após o consumo das plantas transgênicas.

[0079] Portanto, as modalidades da invenção incluem ainda o uso do gene *GIP* para a produção de preparações ou de plantas que podem inibir o crescimento das lagartas que atacam o algodoeiro. As preparações podem ser utilizadas para regular para menos a expressão do gene *GIP* nas lagartas que atacam o algodoeiro. Preferencialmente, as preparações são utilizadas para regular para menos a expressão do gene *GIP* nas lagartas que atacam o algodoeiro

através da inibição da transcrição do gene GIP. Por exemplo, as preparações para inibir as lagartas que atacam o algodoeiro são aquelas que contêm RNAs interferentes capazes de regular para menos a expressão do gene GIP.

Gene *GST1*

[0080] De acordo com uma outra modalidade da invenção, os inventores utilizam o gene da glutathione-S-transferase (*GST1*) para produzir plantas transgênicas para estudar se o mecanismo de interferência de RNA está funcionando. As Figuras 2C e 2D mostram a sequência de DNA do gene *GST1* (SEQ ID NO: 3) e a sequência de proteína (SEQ ID NO: 4), respectivamente.

[0081] Os inventores tomam o gene *GST1* como um exemplo para a construção de um vetor de expressão de dsRNA e o introduzem nas plantas. Os resultados mostram que, após as lagartas que atacam o algodoeiro consumirem as plantas transgênicas que expressam o dsRNA do gene *GST1* da lagarta que ataca o algodoeiro, os níveis de expressão de *GST1* no intestino médio das lagartas que atacam o algodoeiro são regulados para menos e a atividade enzimática de GST é reduzida em uma preparação de proteínas totais do intestino médio das lagartas que atacam o algodoeiro (Figura 6).

dsRNA de fragmento grande pode mediar eficientemente o silenciamento gênico

[0082] Ainda de acordo com uma outra modalidade da invenção, os inventores habilmente utilizam três mutantes de *Arabidopsis thaliana* que possuem mutações em genes de nucleases similares a dicer (isto é, mutantes *dcl2 dcl3 dcl4*) para estudar as formas eficientes de dsRNAs de plantas que induzem o silenciamento de genes de insetos. *Arabidopsis thaliana* possui 4 nucleases similares a dicer (DCL), DCL1 é uma enzima relativamente complexa e pode participar na produção de MicroRNAs e siRNAs. As outras 3 DCL nucleases

estão principalmente envolvidas na produção de siRNAs. Os inventores introduzem uma construção contendo dsRNA do gene GIP de inseto nas plantas mutantes *dcl2 dcl3 dcl4*. O dsRNA de inseto é expresso nas plantas. A maior parte dos dsRNAs mantém o comprimento original e não é processada em siRNA. Entretanto, estes dsRNAs podem ainda silenciar os genes de inseto correspondentes ou ter ainda efeitos melhores (Figura 8).

[0083] Os resultados acima sugerem juntos que a RNAi mediada pela planta em insetos pode ser um mecanismo comum, não limitado a um gene específico. Portanto, a utilização de plantas transgênicas que expressam dsRNA de inseto para inibir insetos que se alimentam de plantas pode ser feita com vários genes de inseto.

[0084] A invenção possui as vantagens a seguir:

(1) Os métodos de interferência de RNA anteriores são limitados à inibição de genes endógenos nos organismos alvos. Em contraste, as modalidades da invenção, pela primeira vez, mostram que as plantas podem ser utilizadas como um intermediário para inibir o crescimento de insetos através da interferência de RNA.

(2) Esta é a primeira demonstração de que *GIP* é um gene importante para a desintoxicação de gossipol em lagartas que atacam o algodoeiro que consomem plantas de algodão contendo gossipol. Assim, o crescimento dos insetos pode ser inibido através da inibição da expressão de GIP.

[0085] A presente invenção pode ser adicionalmente ilustrada em combinação com os exemplos a seguir. Deve ser considerado que estes exemplos são apenas para ilustrar a invenção e não para limitar o âmbito da invenção. As condições experimentais detalhadas não fornecidas nestes exemplos são geralmente conduzidas sob condições convencionais, tais como as descritas em *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3^a ed., Sambrook e outros, Cold Spring Harbor

Laboratory, 2001 ou Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual, Clark e outros, Springer-Verlag, 1997 ou sob condições sugeridas pelos fabricantes.

Exemplo 1. Características da expressão do gene GIP

1. Expressão do gene GIP na lagarta que ataca o algodoeiro

[0086] Para determinar a expressão do gene GIP na lagarta que ataca o algodoeiro, os inventores utilizam um método de RT-PCR para determinar as expressões de GIP em tecidos diferentes. O método é como a seguir: extração do mRNA do mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro, do tecido adiposo, do tubo Malpighiano, da genitália e do tecido cerebral, amplificação do gene GIP através do método de RT-PCR convencional, teste dos produtos amplificados obtidos por eletroforese em gel de agarose, em que, os iniciadores utilizados na RT-PCR são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1

GIP+	5'-GTGCTTTGATGAGACTCTTCG-3'	SEQ ID NO: 5
GIP-	5'-TACATTTGCTATTTATAATTTGC-3'	SEQ ID NO: 6

[0087] A Figura 3A mostra os produtos da RT-PCR em eletroforese em gel. Na figura, as faixas 1-5 representam as expressões do gene GIP no mesentério, no tecido adiposo, no tubo Malpighiano, na genitália e no tecido cerebral, respectivamente. ACTIN (ACT) serve como um controle positivo. É evidente que o gene GIP é superexpresso no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro.

2. Efeitos de vários compostos sobre a expressão de GIP

[0088] Os inventores utilizam o método de RT-PCR para determinar os efeitos de vários compostos sobre a expressão de GIP. O método é como a seguir: um dia após a alimentação da lagarta que ataca o algodoeiro de 5 dias de idade com o mesmo vigor de

crescimento com uma dieta artificial com ou sem 0,1% de xantotoxina, tanino, ácido trans-cinâmico, gossipol, β -pineno, β -cariofileno ou α -pineno, o tecido do mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro é coletado, o mRNA é extraído, o gene GIP é amplificado através do método de RT-PCR convencional e os produtos amplificados são determinados através de eletroforese em gel de agarose. Os iniciadores utilizados na RT-PCR são os mesmos que os descritos na seção "1".

[0089] O resultado é mostrado na Figura 3B. Na figura, as faixas 1-8 representam a expressão do gene GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro alimentada com dieta com ou sem 0,1% de xantotoxina, tanino, ácido trans-cinâmico, gossipol, β -pineno, β -cariofileno ou α -pineno. É evidente que a expressão de GIP expressão é especificamente induzida por gossipol.

3. Efeitos de várias concentrações de gossipol sobre a transcrição do gene GIP

[0090] Os inventores alimentaram a lagarta que ataca o algodoeiro de 5 dias de idade com uma dieta artificial com 0,1% ou 0,2% de gossipol durante 1 dia. Os níveis de transcrição do gene GIP no mesentério de cada larva são determinados através do método de RT-PCT (como descrito anteriormente).

[0091] Os resultados são mostrados nas figuras 3C-D. É evidente que, na presença de gossipol, os níveis de expressão de GIP estão intimamente relacionados com o crescimento da lagarta que ataca o algodoeiro.

Exemplo 2. Isolamento do gene GIP

[0092] Realizar uma diluição em série de 1 μ L da biblioteca de cDNA de *Helicoverpa armigera* (aproximadamente 10^6 ufp (ZAP express), utilizar os iniciadores específicos a seguir para a PCR e determinar a concentração mínima de trabalho da PCR:

GIP2+: 5'-GAAGATTTTCTCGATAAGGAAG-3' (SEQ ID NO: 7)

GIP2-: 5'-ATATAAAGCACTGTGCCACTAAG-3' (SEQ ID NO: 8)

[0093] Submergir uma placa de 96 poços em etanol a 70% durante várias horas e secá-la. Expor à lâmpada ultravioleta durante 15-30 min, adicionar a cada poço 200-300 µL de LB (contendo 10 mM de MgSO₄/0,2% de maltose). Misturar bem uma solução da biblioteca com um certo grau de diluição (1000×) e 400 µL de solução de bactérias XL1-Blue, agitar a cultura a 37°C durante aproximadamente 30 min, adicionar 4 µL da mistura em cada poço. Cultivar a placa a 37°C durante a noite. Após a amplificação, misturar 5 µL de solução de bactéria de 8 poços de cada fileira, total de 12 fileiras por PCR. Realizar a PCR para cada poço nas fileiras com tiras amplificadas. Selecionar um poço positivo para a rodada seguinte de verificação.

[0094] Após 3 rodadas de verificação, plaquear os fagos em placa de LB, selecionar placas de fagos isolados e transferi-las para 500 µL de solução SM, agitar, verificar através da PCR para identificar clones positivos. Realizar o sequenciamento do DNA nos clones positivos, obter o gene de comprimento completo.

[0095] Exemplo 3. Isolamento do gene para a construção de dsGIP, dsGST1

[0096] Utilizando a biblioteca de cDNA de *Helicoverpa armigera* (ZAP express) como um molde, os pares de iniciadores gênicos específicos:

Um par de iniciadores para a obtenção do fragmento do gene GIP:

GIPF: 5'-GAAGATTTTCTCGATAAGGAAG-3' (SEQ ID NO: 7) e

GIPR: 5'-ATATAAAGCACTGTGCCACTAAG-3' (SEQ ID NO: 8); e

[0097] Um par de iniciadores para a obtenção do fragmento do

gene GST 1 (Nº de acesso do GenBank EF033109):

GSTF: 5'-GACCTTGGCAGACCTCAG-3' (SEQ ID NO: 9) e

GSTR: 5'-CCAGCTCGAACCACCTTTT-3' (SEQ ID NO: 10);

[0098] Após a amplificação pela PCR, os fragmentos de GIP e os fragmentos de GST1 podem ser obtidos para a construção dos vetores de expressão *dsGIP* e *dsGST1*, respectivamente.

Exemplo 4. Construção de vetores de expressão e transfecção

1. Construção dos vetores de expressão *35S::dsGFP*, *35S::dsGIP*, *35S::dsGST1*

[0099] A Figura 4A mostra o pBIdsRNA, um vetor de expressão de dsRNA, inclui um promotor 35S, um fragmento senso do gene (isto é, Senso), um íntron do gene RTM de *Arabidopsis thaliana* (isto é, Íntron) (aproximadamente 120 pb) e um segmento antissenso do gene (isto é, Antissenso) e o terminador de NOS. O pBIdsRNA é construído através da substituição do fragmento de GUS no vetor pBI121 (mostrado no pBI121 da Figura 4A) por uma sequência contendo Senso-Íntron-Antissenso.

[00100] Os inventores primeiro realizam uma amplificação através da PCR do íntron (aproximadamente 120 pb) do gene RTM de *Arabidopsis thaliana* (AT2G43730) com os iniciadores específicos RTM+ e RTM-, que contêm XbaI e NotI, com uma DNA polimerase de alta fidelidade KOD. Após a digestão dupla dos produtos da PCR com as enzimas de restrição XbaI e NotI, os fragmentos digeridos são clonados em sítios de clonagem múltipla entre XbaI e NotI do pBSK (obtido na Clontech company).

[00101] Realizar a amplificação através da PCR utilizando os iniciadores específicos ao gene FGFP+ e FGFP-; FGIP+ e FGIP-; FGST1+ e FGST1-, que contêm os sítios de enzimas de restrição NotI e SacI, uma DNA polimerase de alta fidelidade, utilizando GFP (do plasmídeo pCAMBIA 1302 (ver www.cambia.org/daisy/bios/585.html),

este gene não está presente na lagarta que ataca o algodoeiro) e GIP ou GST1 obtido no Exemplo 3 como moldes e clonar os fragmentos de GFP, GIP e GST1 correspondentes. Realizar a digestão dupla dos fragmentos clonados com NotI e SacI e inserir os fragmentos digeridos entre os sítios de clonagem (NotI/SacI) no vetor pBSK, que carrega o íntron de RTM.

[00102] Ao mesmo tempo, realizar a amplificação através da PCR com os iniciadores específicos ao gene RGFP+ e RGFP-; RGIP+ e RGIP-; RGSL+ e RGSL-, que contêm os sítios das enzimas SmaI e XbaI, com uma DNA polimerase de alta fidelidade KOD, utilizando GFP e GIP ou GST1 obtidos no Exemplo 3 como moldes e clonar os fragmentos de GFP, GIP, GST1 entre SmaI e XbaI do pBSK dos fragmentos senso de GFP, GIP e GST1 descritos anteriormente.

[00103] Realizar a digestão dupla nos vetores pBSK/dsGFP, pBSK/dsGIP e pBSK/dsGSL com SmaI e SacI. Realizar a digestão dupla no pBI121 (obtido na Clontech company) com SmaI e SacI para remover GUS. Inserir os fragmentos de dsGFP, dsGIP, dsGSL obtidos na digestão dupla entre SmaI e SacI para a obtenção de vetores de expressão recombinantes carregando fragmentos alvos correspondentes, isto é, os vetores de expressão 35S::dsGFP, 35S::dsGIP, 35S::dsGST1.

Os iniciadores utilizados na construção são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2

Denominações	Sequências	SEQ ID NO:
RTM+	5'- CCCTCTAGAACGTTGTAAGTCTGATTTTTGAC -3'	11
RTM-	5'- CCCGCGGCCGCTCTATCTGCTGGGTCCAAATC -3'	12
FGFP+	5'- CCCGAGCTCGAAGATTTTCTCGATAAGGAAG -3'	13
FGFP-	5'- CCCGCGGCCGCGCATATAAAGCACTGTGCCACTAAG -3'	14
FGIP+	5'- CCCCCCGGGGAAGATTTTCTCGATAAGGAAG -3'	15

FGIP-	5'- CCCTCTAGAAATATAAAGCACTGTGCCACTAAG -3'	16
FGST1+	5'- CCCGAGCTCCGATTTCAAGGAGGACGG -3'	17
FGST1-	5'- CCCGCGGCCGCCCATGCCATGTGTAATCCC -3'	18
RGFP+	5'- CCCCCCGGGCGATTTCAAGGAGGACGG -3'	19
RGFP-	5'- CCCTCTAGACCATGCCATGTGTAATCCC -3'	20
RGIP+	5'- CCCGAGCTCGACCTTGGCAGACCTCAG -3'	21
RGIP-	5'- CCCGCGGCCGCCCAGCTCGAACCACTTTT -3'	22
RGSL+	5'- CCCCCCGGGGACCTTGGCAGACCTCAG -3'	23
RGSL-	5'- CCCTCTAGACCAGCTCGAACCACTTTT -3'	24

2. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

[00104] O método de congelamento-descongelamento é utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*. Uma colônia isolada de LBA4404 ou de GV3101 (ambas obtidas na Invitrogen company), 3 mL de meio de cultura LB (contendo 25 µg/mL de rifamicina (Rif) e 50 µg/mL de canamicina (Kan) ou gentamicina (Gen)), 28°C, 220 rpm, incubação durante a noite. 2 mL de líquido de bactéria, 50 mL de meio de cultura LB (25 µg/mL de Rif e 50 µg/mL de Gen), 28°C, 220 rpm, cultivados até $DO_{600} = 0,5$ (aproximadamente 6 h). Colocar a cultura em gelo durante 30 min, 4°C, centrifugação a 5000 g durante 5 min. Ressuspender em 10 mL de 0,15 M de NaCl. 4°C, centrifugação a 5000 g durante 5 min. Ressuspender em 1 mL de 20 mM de $CaCl_2$, separar agrupado em 50 µL/tubo, congelamento instantâneo em nitrogênio líquido, preservar a célula competente a -70°C. Misturar os vetores binários contendo os genes alvos e célula competente a 50 µL/tubo, colocar em gelo durante 30 min, congelamento instantâneo em nitrogênio líquido durante 1 min. Descongelar o líquido bacteriano em banho de água a 37°C durante 5 min, adicionar 1 mL de meio de cultura LB, 28°C, 220 rpm, durante 2-4 h de cultura. Tirar 50-100 µL do meio de cultura LB e plaquear na placa (25 µL/mL de Rif, 50 µg/mL de Gen e 50 µg/mL de Canamicina (Kan) ou higromicina (Hyg)).

Exemplo 5. Transfecção de plantas e verificação em relação à progênie transgênica

[00105] Nesta modalidade, o tabaco e a *Arabidopsis thaliana* são utilizados como exemplos. Outras plantas podem ser transfectadas utilizando métodos similares.

a. Transgenes de tabaco

[00106] Cultivar durante a noite *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 contendo os genes alvos (cultura durante a noite a 28°C, até $DO_{600} \approx 2,0$). Cortar de forma asséptica a folha do tabaco no tamanho de aproximadamente 0,1 cm², mergulhar no meio de cultura de *Agrobacterium tumefaciens* durante 5-10 min. Absorver meio de cultura extra de *Agrobacterium tumefaciens* com papel de filtro asséptico, colocar a folha de tabaco imersa sobre meio de cultura sólido 1/2MS durante 2 dias sem luz. Então transferir a folha para o meio de cultura de seleção sólido MS (contendo 1 mg/L de 6-BA) (Kan^r, Cef^r), trocar por MS fresco a cada 10-15 dias, até o broto crescer partindo da folha ferida, então transferir os novos brotos para o meio de cultura MS isento de 6-BA, trocar por MS fresco a cada 10-15 dias e transferir os brotos para o solo após os brotos desenvolverem raízes.

[00107] Meio de cultura MS: 4,4 g/L de meio basal de Murashige e Skoog (Sigma, Cat. M5519), 15 g/L de sacarose, 0,8% de pó de ágar, 0,5 g/L de MES, pH 5,7.

b. Transgenes de *Arabidopsis thaliana*

[00108] O método de imersão floral é utilizado na transfecção da planta de *Arabidopsis thaliana* (Clough e Bent, 1998, Plant J. 16, 735-743). Colônia isolada de GV3101 contendo o vetor binário, 3 mL de meio de cultura LB (25 µg/mL de Rif, 50 µg/mL de Gen e 50 µg/mL de Kan ou Hyg), 28°C, 220 rpm, 12 h. 2 mL de líquido de bactéria, 50 mL de meio de cultura LB (25 µg/mL de Rif, 50 µg/mL de Gen e 50 µg/mL

de Kan ou Hyg), 28°C, 220 rpm, 12 h. 50 mL de líquido de bactéria, 250 mL de meio de cultura LB (50 µg/mL de Gen e 50 µg/mL de Kan ou Hyg), 28°C, 220 rpm, 12 h. 4200 rpm (2900g), 15 min. Ressuspender as bactérias em 500 mL de uma solução de sacarose a 5% contendo 0,02% de Silwet L-77. Mergulhar a parte floral da planta no líquido de bactéria durante 5 segundos, colocá-la de forma plana sobre uma bacia plástica, manter a umidade, evitar a luz durante 16-24 h, crescer em estufa até florescer e produzir sementes. Realizar a aceleração do desenvolvimento em relação às sementes TO a 4°C durante 2-4 d, tratar com 20% de água para branqueamento (Whitecat company, Shanghai) durante 15 min, lavar com água esterilizada 3-4 vezes. Suspende em 0,5% de Agarose (55°C), colocar no meio de cultura LB de 0,6% de ágar (contendo 50 µg/mL de Kan ou Hyg), 22°C, iluminação contínua, durante aproximadamente 1 semana e transferir a planta jovem resistente verde para o solo com nutrientes (turfa:vermiculita:perlita = 1:1:1) para crescimento.

c. Transgenes de algodão

[00109] As sementes de algodão R15 (*Gossypium hirsutum* Linn) são colocadas em meio de cultura MS0 após a esterilização, germinadas e crescidas na escuridão, 5-7 dias depois, os hipocotilédones das plantas jovens são cortados de forma asséptica em segmentos de aproximadamente 1,0 cm na forma de explantes transformados. Os explantes são imersos e infectados no líquido de bactéria de *Agrobacterium tumefaciens* durante 15-20 min, transferidos para o meio de cocultura MSB1, a 22°C durante 2d sem luz. Transferir os explantes para o meio de cultura MSB2 para induzir calo. Os explantes crescem novamente em plantas jovens resistentes em tubo de ensaio após a indução de calo, a propagação de calo e a indução de calo embrionário (meio de cultura MSB3), embriogênese de células do corpo (meio de cultura MSB4). Quando regeneradas, as plantas

desenvolvem 3-4 folhas verdadeiras, enxertar ou transplantar as plantas e transferir as plantas para vasos de jardim em câmaras com clima controlado.

MS0: sal de 1/2 MS + 5 g/L de glicose + 7 g/L de pó de ágar, pH 5,8.

MSB1: sal de MS + B5 orgânico + 30 g/L de glicose + 0,1 mg/L de KT + 0,1 mg/L de 2,4-D + 2,2 g/L de Gelrite, pH 5,8.

MSB2: MSB1 + 500 mg/L de cefalotina + 80 mg/L de canamicina.

MSB3: sal de MS + B5 orgânico + 30 g/L de glicose + 2,5 g/L de Gelrite, pH 5,8.

MSB4: sal de MS + B5 orgânico + 30 g/L de glicose + 1,0 g/L de amida de *Asparagus cochinchinensis* + 2,0 g/L de glutamina + 3,0 g/L de Gelrite, pH 5,8; duplo KNO₃ em sal de MS, remover NH₄NO₃.

Exemplo 6. Identificação por biologia molecular de plantas transgênicas

[00110] Nesta modalidade, selecionar linhagem homozigota da geração T3 de plantas transgênicas obtidas do Exemplo 5, após a seleção com antibióticos e identificar as plantas transgênicas utilizando hibridização por Northern.

[00111] Uso de transferência para membrana de Northern blot para a detecção de RNA interferente:

[00112] Transferência para membrana: extrair amostras de RNA de plantas transgênicas utilizando métodos convencionais, adicionar 10x líquido de amostra para eletroforese nas amostras de RNA, misturar bem, deixar em repouso a 65°C durante 10 min, resfriar em gelo. Realizar a eletroforese utilizando 15% de TBE-ureia PAGE gel, tampão de eletroforese 1×TBE. Submeter à pré-eletroforese 5-10 min e lavar os poços de amostra com o tampão de eletroforese antes de carregar

as amostras, remover a ureia extraída dos poços. Carregar 10-20 µg do RNA total em cada poço, com intensidade de campo elétrico a 20 V/cm, interromper a eletroforese quando o corante azul de bromofenol migrar para o fundo do gel. Equilibrar o gel em 1×TBE durante 10 min. Transferir o RNA utilizando Hofer Semi-Dry Transfer Units, Amersham, Cat. 80-6211-86. Condições de transferência: 40 mA (aproximadamente 7-8 V), 2-4 h, membrana de nylon Hybond-N⁺ (Amersham, Cat. RPN303B). A membrana de nylon é lavada rapidamente com solução 6×SSC, reticulada com ultravioleta (120 mJ), é feito um "sanduíche" da membrana entre dois papéis de filtro, assado a 80°C durante 1 h, pronta para uso.

[00113] Líquido de armazenamento do gel da eletroforese: 15% de poliacrilamida (30% de Acil/Bis, 19:1, Huashun, Cat. W443), 8 M ureia, 1×TBE;

15% de TBE-ureia PAGE gel (10 mL): 10 mL de líquido para armazenamento do gel da eletroforese, 80 µL de persulfato de amônio a 10%, 5 µL de TEMED, misturar bem.

10×TBE: 0,9 M de Tris, 0,9 M de ácido bórico, 20 mM de EDTA (pH 8,0) (Sigma, Cat. T4415);

Líquido de amostra para eletroforese 10×: (Ambion, cat. 8546G).

[00114] Marcação da sonda: utilizar 25 ng dos produtos da PCR purificados como molde de marcação das sondas. A marcação das sondas é realizada utilizando o Prime-a-Gene Labeling System (Promega, Cat. U1100). Banho morno a 37°C durante 1 h. Incubar a sonda marcada em água em ebulição durante 5 min, então transferir imediatamente para gelo, pronta para uso.

[00115] Pré-hibridização e hibridização (utilizando o ExpressHyb system da Clontech): colocar a membrana de nylon em um tubo de hibridização, umedecer com 6×SSC, garantir que não há bolhas de ar

entre a membrana e a parede do tubo. Remover o 6×SSC, adicionar 5 mL de líquido de hibridização, realizar a pré-hibridização a 37°C durante 60 min. Após a pré-hibridização, substituir com 5 mL de solução de hibridização fresca, adicionar as sondas dentro, misturar bem e realizar a hibridização durante a noite.

[00116] Lavagem da membrana e exposição a filmes: após a hibridização, remover a solução de hibridização. À temperatura ambiente, lavar a membrana duas vezes com 2×SSC, 0,05% de SDS, 5 min cada, então lavar duas vezes com 0,2×SSC, 0,1% de SDS, 20 min cada. Embrulhar a membrana com filme de preservação, estabilizado com fita adesiva, com tela de intensificação e filme de raio X, -70°C, 2 dias. O filme é revelado utilizando líquido D-72.

[00117] A Figura 4B mostra os resultados da análise de Northern blot sobre a sequência de dsRNA de *GIP*, *GFP* ou *GST1* em tabaco e *Arabidopsis thaliana* transgênicos. Na Figura 4B, WT é a planta de controle do tipo selvagem, as faixas que possuem sinais mostram a expressão do dsRNA de genes indicados nas plantas indicadas.

[00118] Exemplo 7. Efeito sobre a lagarta que ataca o algodoeiro pelo dsRNA de *Arabidopsis thaliana* e tabaco transgênicos expressando o gene *GIP*

[00119] Alimentar a lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade que possui o mesmo vigor de crescimento com dsGFP (controle), dsGIP de tabaco ou *Arabidopsis thaliana* transgênica, 4-7 dias depois, registrar os pesos, dissecar e coletar o mesentério. Extrair o DNA e determinar a expressão do *GIP* utilizando a análise de Northern blot.

Extração de RNA:

[00120] Triturar os materiais (aproximadamente 100 mg) em nitrogênio líquido. Transferi-los para um tubo de centrífuga de 1,5 mL, adicionar 1 mL de Trizol (Invitrogen, Cat. 15596-018), misturar bem,

deixar em repouso à temperatura ambiente durante 5 min. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min, descartar o precipitado. Adicionar 200 µL de triclorometano no sobrenadante, misturar bem, centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min. Coletar o sobrenadante, adicionar 500 µL de isopropanol para a precipitação do RNA. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 min, lavar o precipitado com etanol a 70%, secar a vácuo, dissolver em 20-50 µL de H₂O (isenta de RNase).

[00121] Diluir o RNA com 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) até alguma extensão, determinar os valores de absorção em UV no comprimento de onda de 200 nm-300 nm. Concentração de RNA = $40 \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times \text{taxa de diluição}$.

[00122] Transferir o RNA para a membrana para a análise comum de Northern blot:

Adicionar o tampão de amostra de RNA 5× e o de eletroforese de RNA 10× (formaldeído) na solução de amostra de RNA, misturar bem, deixar em repouso a 65°C durante 10 min, resfriar em gelo. Carregar 15 µg do RNA total em cada linha, 1,1% de gel de agarose modificado é utilizado na eletroforese, tampão de eletroforese 1×MOPS, com intensidade de campo elétrico de 8 V/cm. Interromper a eletroforese quando o corante azul de bromofenol migrar para 2/3 do gel. Lavar o gel com ddH₂O e equilibrar o gel em 20×SSC durante 40 min. Construir uma plataforma de transferência, 20×SSC utilizado como tampão de transferência, transferir o RNA para membrana de nylon Hybond-XL (Amersham, Cat. RPN303S) através do método de capilaridade (aproximadamente 18 h). Após a transferência, marcar as posições dos poços das amostras na membrana com lápis, marcar a membrana cortando o canto esquerdo superior da membrana. A membrana é rapidamente lavada com solução 6×SSC, reticulada com ultravioleta (120 mJ), é feito um "sanduíche" da membrana entre dois papéis de filtro, assado a 80°C durante 2 h, armazenamento

hermético, pronta para uso.

[00123] O processo de hibridização é o mesmo que para a análise de Northern blot do RNA interferente.

[00124] Os resultados mostram que a transcrição do gene GIP é inibida no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta do dsGIP de *Arabidopsis thaliana* *AtdsGIP-3* (isto é, o terceiro clone de *Arabidopsis thaliana* transgênica expressando dsGIP detectado na Figura 4B do Exemplo 6) do tabaco *NtdsGIP-2* (isto é, o segundo clone do tabaco transgênico expressando dsGIP detectado na Figura 4B do Exemplo 6) quando comparada com a da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta do dsGFP de *Arabidopsis thaliana* *AtdsGFP* (isto é, o quinto clone de *Arabidopsis thaliana* transgênica expressando dsGFP detectado na Figura 4B do Exemplo 6) ou do tabaco *NtdsGFP* (isto é, o segundo clone do tabaco transgênico expressando dsGFP detectado na Figura 4B do Exemplo 6) (controle). A primeira lagarta que ataca o algodoeiro cresce lentamente. Ver a Figura 5 e a Figura 6 para detalhes.

[00125] A Figura 5A mostra a análise de Northern blot no RNA pequeno contendo a sequência de GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade 2 dias após se alimentar de *Arabidopsis thaliana* *AtdsGIP-3*. As faixas 1 e 2 são a lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de *AtdsGFP* e *AtdsGIP-3*, respectivamente. Uma grande quantidade de moléculas de RNA pequeno de GIP pode ser observada no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro após a alimentação.

[00126] A Figura 5B mostra a análise de Northern blot sobre as alterações na transcrição do gene GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade 4 dias após se alimentar de plantas transgênicas diferentes expressando dsRNA. Nos resultados que mostram a lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de

Arabidopsis thaliana expressando o RNA do gene GIP (GIP na figura), as faixas 1, 2, 3, 4 e 5 representam os resultados do teste do RNA de GIP RNA do mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de *Atds GFP* e as linhagens 2, 3, 4 e 5 de dsGIP de *Arabidopsis thaliana* transgênica na Figura 4B, respectivamente, na figura, RNA indica o controle (isto é, RNA 18s). Nos resultados do teste de GIP da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta tabaco, as faixas 1, 2 e 3 representam os resultados do teste do RNA de GIP do mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta do tabaco do tipo selvagem e de *NtdsGFP* e da linhagem 2 do dsGIP do tabaco transgênico detectado na Figura 4B. Pode ser observado que após se alimentar de plantas contendo dsGIP, a transcrição do gene GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro é enormemente reduzida.

[00127] A Figura 5C mostra o ganho de peso corporal médio (parte superior) da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade 4 dias após se alimentar de *AtdsGFP*, *AtdsGIP-3* e as alterações na transcrição do gene GIP no mesentério detectadas através da análise de Northern blot. Os Testes I, II e III representam três testes de alimentação independentes. Pode ser observado que após se alimentar de *AtdsGIP-3*, o ganho de peso é obviamente mais lento que daquelas que se alimentam de *AtdsGFP*. Em adição, após se alimentar de *AtdsGIP-3*, a transcrição do gene GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro é obviamente menor que no daquela que se alimenta de *AtdsGFP*.

[00128] A Figura 5D mostra o ganho de peso corporal médio (parte superior) da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade 4 dias após se alimentar de *NtdsGFP*, *NtdsGIP-2* e as alterações na transcrição do gene GIP no mesentério detectadas através da análise de Northern blot. Os Testes I, II e III representam três testes de

alimentação independentes. Pode ser observado que após se alimentar de *NtdsGIP-2*, o ganho de peso é obviamente mais lento que daquelas que se alimentam de *NtdsGFP*. Em adição, após se alimentar de *NtdsGIP-2*, a transcrição do gene GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro é obviamente menor que no daquela que se alimenta de *NtdsGFP*.

[00129] A Figura 5E mostra a análise imuno-histoquímica da distribuição da proteína GIP no mesentério 4 dias após a alimentação com tabaco *NtdsGFP(a-c)*, *NtdsGIP-2(d-f)*. a, b, c ou d, e, f representam resultados de testes individuais. Pode ser observado que a distribuição de GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro após se alimentar de dsGIP do tabaco é relativamente menor.

[00130] A Figura 5F mostra os níveis de transcrição do gene GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade nos dias 1, 2 e 4 após se alimentar do tabaco *NtdsGFP* (1) e *NtdsGIP-2* (2). Pode ser observado que o nível de transcrição da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de *NtdsGIP-2* é diminuído ao longo do tempo; mas os níveis de transcrição do gene GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de *NtdsGFP* variam pouco.

[00131] A Figura 5G mostra o ganho de peso corporal médio da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade no dia 2 e no dia 4 após se alimentar de *NtdsGFP* (coluna em preto) e de *NtdsGIP-2* (coluna branca). Pode ser observado que o ganho de peso da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de *NtdsGIP-2* é obviamente menor que daquelas que se alimentam de *NtdsGFP*.

[00132] A Figura 5H mostra o ganho de peso corporal médio (parte superior) da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade no dia 4 e no dia 5 após se alimentar de *AtdsGFP* (coluna em preto) e de *Arabidopsis* transgênica *AtdsGIP-3* (coluna branca) e os níveis de

transcrição do gene GIP (parte inferior) detectados através da análise de Northern blot. Pode ser observado que o ganho de peso da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de *AtdsGIP-3* é obviamente menor que daquelas que se alimentam de *AtdsGFP*. Em adição, os níveis de transcrição do gene GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de *AtdsGIP-3* são obviamente menores que no daquelas que se alimentam de *AtdsGFP*.

Exemplo 8. Efeito sobre a lagarta que ataca o algodoeiro pelo dsRNA do algodão transgênico expressando o gene GIP

[00133] Alimentar a lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade que possui o mesmo vigor de crescimento com R15 (controle, *Gossypium hirsutum* Linn) e algodão transgênico ds-2, -7, -9 e -10 (4 linhagens de expressão mais alta na análise de Northern blot mostradas na Figura 4B) durante 4 dias. Registrar o peso. Os resultados são mostrados na Figura 6.

[00134] A Figura 6A mostra a análise de Northern blot do RNA do dsGIP no algodão transgênico. R15: *Gossypium hirsutum* Linn, 1-10: algodão transgênico diferente.

[00135] A Figura 6B mostra os ganhos de peso corporal da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade com o mesmo vigor de crescimento vigor após se alimentar de R15 e dsGIP de algodão transgênico diferente durante 4 dias. Eixo y: ganho de peso corporal líquido, em mg, por teste T, $P < 0,01$. Pode ser observado partindo dos resultados na Figura 6 que o crescimento é inibido na lagarta que ataca o algodoeiro após se alimentar de dsRNA de algodão transgênico expressando o gene GIP.

Exemplo 9. Efeito sobre a lagarta que ataca o algodoeiro pelo dsRNA da planta expressando o gene GST1

[00136] Alimentar a lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade com o mesmo vigor de crescimento com *dsGFP* (controle),

dsGST1 de *Arabidopsis thaliana* transgênica durante 4 dias, registrar o peso, dissecar e coletar o mesentério. Dividir em duas partes, uma para a extração do RNA e para a análise de Northern blot para a detecção da expressão de GST1, a outra parte para o isolamento da proteína total para a determinação da atividade enzimática de GST.

[00137] A Figura 7 mostra o efeito sobre a lagarta que ataca o algodoeiro pelo *dsGST1-5* de *Arabidopsis thaliana* transgênica, que expressa o dsRNA do gene GST1 (isto é, linhagem 5 de dsGST 1 de *Arabidopsis thaliana* transgênica detectado na Figura 4B do Exemplo 6).

[00138] A Figura 7A mostra a alteração na expressão do gene GST 1 no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro de 5 dias de idade com o mesmo vigor de crescimento 1 dia após a alimentação com uma dieta artificial contendo 1 mg/g de gossipol. As faixas 1 e 2 são lagartas que atacam o algodoeiro que se alimentam da dieta artificial com ou sem 1 mg/g de gossipol, respectivamente. Pode ser observado que o gossipol não possui efeito significativo sobre a expressão do gene GST1 no mesentério.

[00139] A Figura 7B mostra a alteração na expressão do gene GST 1 no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade com o mesmo vigor de crescimento 4 dia após se alimentar de *AtdsGFP* (Faixa 1) e *dsGST1-5* (Faixa 2) de *Arabidopsis thaliana* transgênica. Os Testes I e II representam dois testes de alimentação independentes. Pode ser observado que a expressão do gene GST 1 sofre interferência pelo RNA interferente correspondente do GST1. Assim, a RNAi mediada por planta no inseto é um mecanismo comum.

Isolamento de proteínas:

[00140] Extração de proteínas totais no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro: triturar os tecidos do mesentério em nitrogênio líquido, adicionar uma quantidade apropriada de PBS pré-resfriado,

misturar bem, filtrar com gaze de 8 camadas, centrifugar (10.000 rpm, 10 min). Coletar o sobrenadante, medir a concentração de proteína utilizando a colorimetria de Bradford e analisar a atividade enzimática.

Determinar a atividade enzimática de GST

[00141] Medir a atividade enzimática de acordo com o kit de reagentes da glutathione-S transferase fornecido pelo Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute.

Mecanismo de medida

Glutathione + 1 cloro-2,4-dinitrobenzeno $\xrightarrow{\text{GST}}$ glutathione complexo de dinitrobenzeno + ácido clorídrico



[00142] A GST pode catalisar uma reação de glutathione reduzida (GSH) e 1 cloro-2,4-dinitrobenzeno (substrato de CDNB), dentro de um certo tempo de reação, a atividade enzimática possui uma relação linear com as alterações na concentração do substrato antes e depois da reação.

[00143] A Figura 7C mostra os resultados da atividade enzimática da GST. Pode ser observado que após se alimentar de *dsGST1* da *Arabidopsis thaliana* transgênica, a atividade enzimática da GST no intestino da lagarta que ataca o algodoeiro é significativamente reduzida.

Exemplo 10. O dsRNA de fragmento grande pode também silenciar eficientemente os genes alvos

[00144] De acordo com o Exemplo 5, que fornece métodos para gerar *Arabidopsis thaliana* transgênica e para verificar a progênie transgênica, transfectar o dsGIP na planta de *Arabidopsis thaliana* triplo mutante *dc12*, *dc13*, *dc14* (triplo mutante *dc12*, *dc13*, *dc14* obtido de Z Xie, Center for Gene Research and Biotechnology, Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331, USA) para a obtenção da *Arabidopsis thaliana*

transgênica. Selecionar 4 linhagens transgênicas, dcl AtdsGIP-11 até dcl AtdsGIP-14 (dcl 11-14 para abreviação na Figura 8), como controle, selecionar duas linhagens transgênicas no Exemplo 6, AtdsGIP-7 e AtdsGIP-8 (WT 7-8 para abreviação na Figura 8) como controle. Extrair o RNA de acordo com o método descrito no Exemplo 7 para a análise de Northern blot. Pegar uma lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade com o mesmo vigor de crescimento, alimentar com dcl AtdsGIP (11-14) e AtdsGIP (7, 8) (como controle) durante 3 dias, então dissecar e coletar o intestino médio. Extrair o RNA e realizar a análise de Northern blot para a expressão de GIP. Os resultados são mostrados na Figura 8. A Figura 8a mostra o dsGIP de fragmento grande na *Arabidopsis thaliana* transgênica detectado através da análise de Northern blot. A Figura 8b mostra a molécula pequena de dsGIP na *Arabidopsis thaliana* transgênica detectada através da análise de Northern blot. A Figura 8c mostra o produto da transcrição do GIP no mesentério da larva da lagarta que ataca o algodoeiro de 3 dias de idade 3 dias após se alimentar de plantas transgênicas diferentes. O sinal de hibridização do RNA é quantificado pela tela de fósforo da Fuji, ACT utilizado como controle interno, para calcular a quantidade relativa (GIP/ACT). A quantidade relativa de GIP no mesentério da lagarta que ataca o algodoeiro que se alimenta de plantas que não são transgênicas é definida como 1. WT: base de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (Co10), dcl: base de triplo mutante *dcl2 dcl3 dcl4*. CK: planta não transgênica, 7-14 representam plantas transgênicas diferentes.

[00145] Os resultados da Figura 8 são mostrados na base de triplo mutante *dcl2 dcl3 dcl4*, o dsRNA de fragmento grande, quando comparado com plantas transgênicas do tipo selvagem, tinha se acumulado significativamente. Uma grande quantidade do dsRNA de fragmento grande é detectada na planta transgênica AtdsGIP-13, mas

uma quantidade muito baixa de dsRNA de molécula pequena é detectada. Se a lagarta que ataca o algodoeiro comer esta planta transgênica, a transcrição do gene GIP no mesentério é significativamente inibida e altamente eficiente. Isto mostra que durante a interferência de RNA do gene de inseto mediada por planta, o dsRNA de fragmento grande gerado no corpo de planta também participa neste processo e é mais eficiente.

[00146] Todas as literaturas mencionadas aqui são incorporadas como referência nesta invenção, como se cada referência de literatura fosse citada isoladamente e deve ser considerado que os versados na técnica podem modificar ou alterar a invenção após a leitura da descrição acima da invenção, estas variações também se encaixam dentro do âmbito das reivindicações da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para aumentar a resistência de uma planta a insetos, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas a seguir:

transfecção de uma construção à expressão de um dsRNA do gene de inseto em uma célula, um tecido ou um órgão vegetal, sendo que a dita construção à expressão do dsRNA do gene de inseto é de fita dupla e sua fita senso ou fita antissenso contém uma estrutura que é mostrada na Fórmula 1:

$Seq_{\text{senso}}-X-Seq_{\text{antissenso}}$ Fórmula 1

na qual

Seq_{senso} é uma sequência senso ou um fragmento de um gene de inseto, sendo que o dito fragmento apresenta pelo menos 50 pb de comprimento;

$Seq_{\text{antissenso}}$ é uma sequência ou um fragmento complementar à Seq_{senso} , sendo que o dito fragmento apresenta pelo menos 50 pb de comprimento;

X é uma sequência interveniente entre a Seq_{senso} e a $Seq_{\text{antissenso}}$, e a dita sequência interveniente não é complementar à Seq_{senso} ou à $Seq_{\text{antissenso}}$, e

sendo que o gene de inseto codifica GIP apresentando a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita construção está em um vetor de expressão, e o dito vetor de expressão compreende um promotor para a ativação da transcrição gênica na planta.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito gene de inseto é necessário ao crescimento do inseto ou pode afetar o crescimento e o desenvolvimento do inseto em condições específicas.

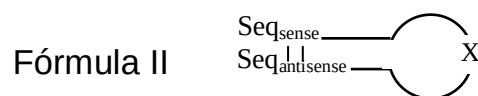
4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito gene de inseto é expresso no estômago ou nos intestinos de um inseto.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita planta é selecionada de dicotiledônea, monocotiledônea ou gimnosperma.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito inseto é selecionado daqueles que se alimentam de plantas.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita sequência interveniente apresenta 80-300 pb de comprimento.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que após a construção à expressão do dsRNA do gene de inseto ser transfectada na célula, no tecido ou no órgão vegetal, o dsRNA do gene de inseto da Fórmula II é formado na célula, no tecido ou no órgão vegetal,



na qual,

Seq_{sense}, Seq_{antisense} e X, são como definidos na reivindicação 1,

|| indica pontes de hidrogênio formadas entre a Seq_{sense} e a Seq_{antisense}.

9. Uso de um dsRNA do gene de inseto, caracterizado pelo fato de que é para produção de uma planta resistente a insetos, sendo que o gene de inseto codifica GIP apresentando a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

10. Uso de um polinucleotídeo isolado, caracterizado pelo fato de que é para produção de uma preparação ou de uma planta que

pode inibir o crescimento de insetos,

sendo que o polinucleotídeo isolado é selecionado a partir do grupo:

(a) uma sequência de nucleotídeos apresentando a sequência de SEQ ID NO: 1;

(b) uma sequência de fragmento de polinucleotídeo não inferior a 50 nucleotídeos contínuos de SEQ ID NO: 1, e o fragmento pode silenciar o gene GIP; ou

(c) uma sequência de nucleotídeos que é complementar à sequência em (a), ou (b).

11. Uso, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a dita preparação ou a dita planta contém dsRNA, que pode silenciar o gene GIP.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o dito dsRNA contém uma estrutura que é mostrada na Fórmula I:

Seq₁-X-Seq₂ Fórmula I

na qual

Seq₁ é uma sequência ou um fragmento do gene GIP, em que o dito fragmento apresenta pelo menos 50 pb de comprimento;

Seq₂ é uma sequência de nucleotídeos ou um fragmento complementar à Seq₁, sendo que o dito fragmento apresenta pelo menos 50 pb de comprimento;

X é uma sequência interveniente entre Seq₁ e Seq₂, e a dita sequência intermediária não é complementar à Seq₁ ou à Seq₂.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o dito inseto é a lagarta que ataca o algodoeiro.

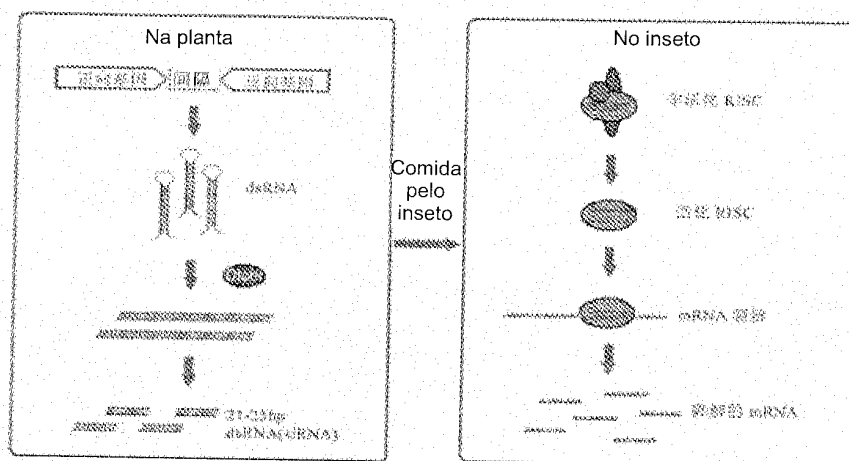


Fig. 1

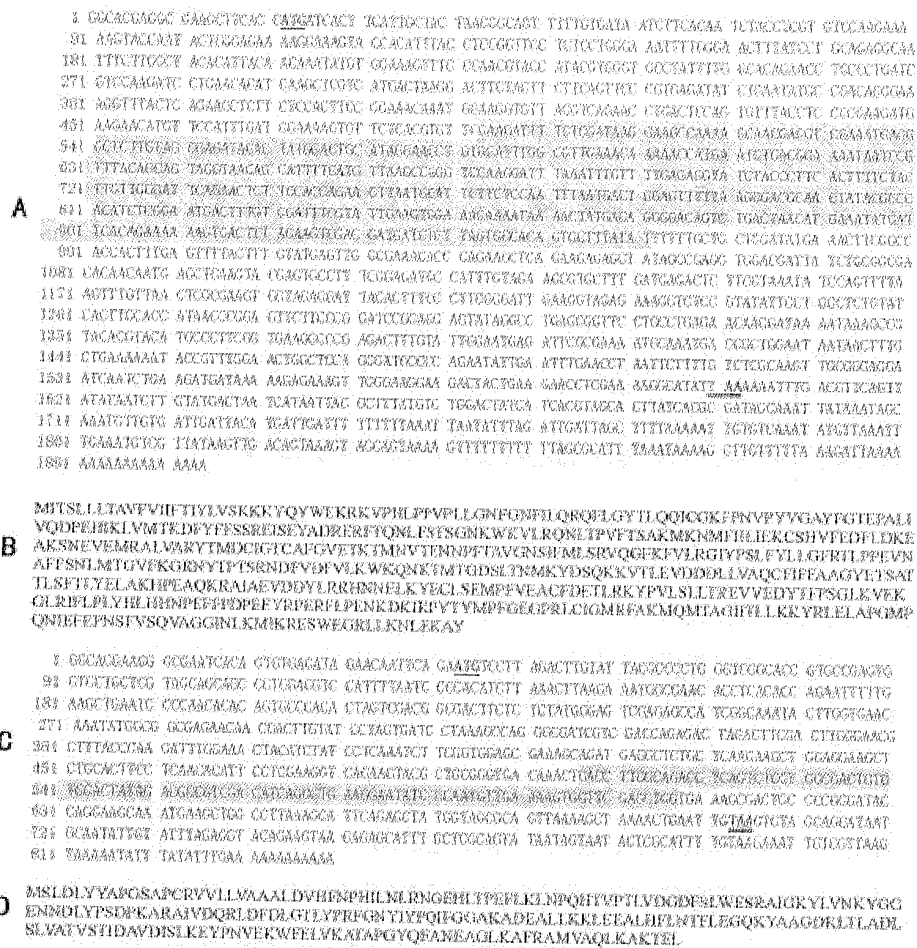


Fig. 2

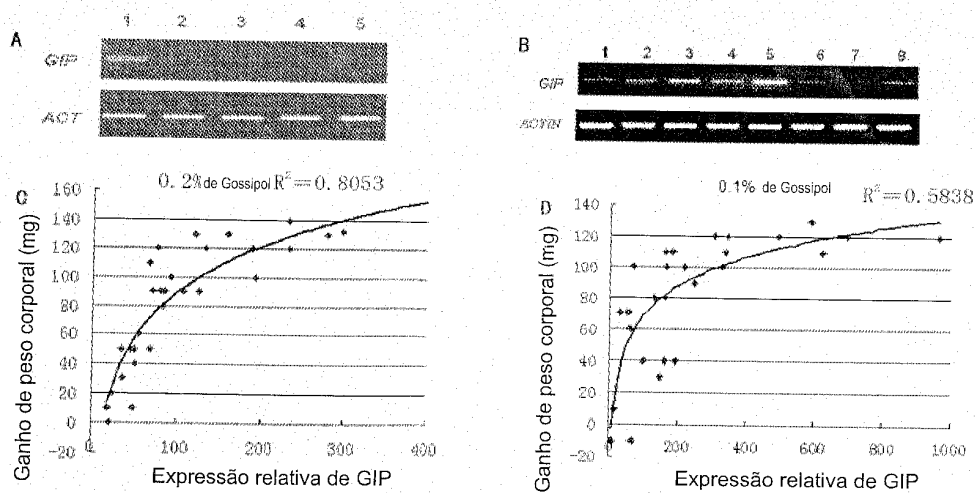


Fig. 3

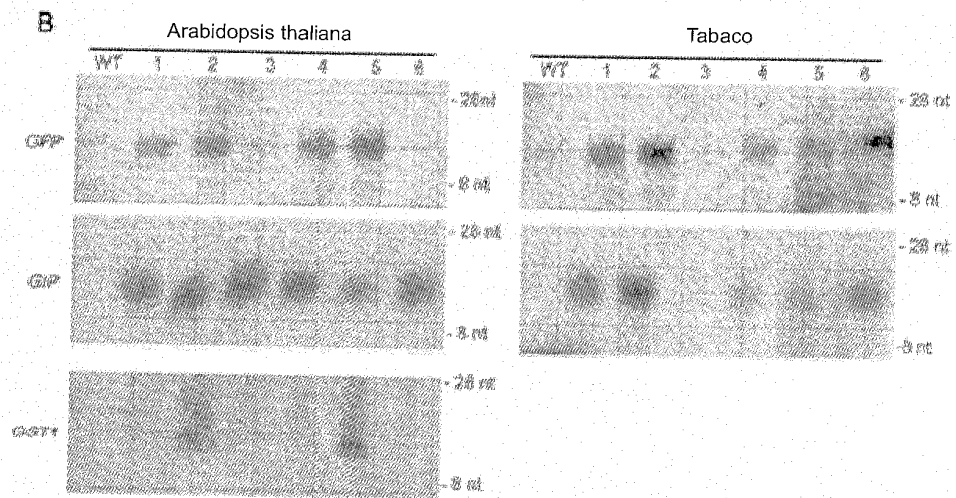
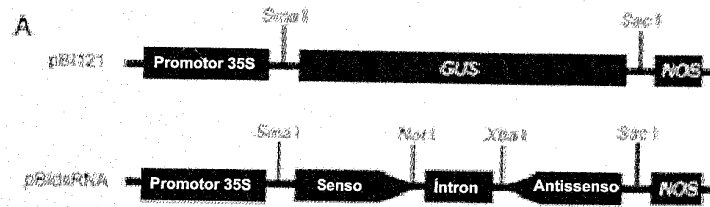


Fig. 4

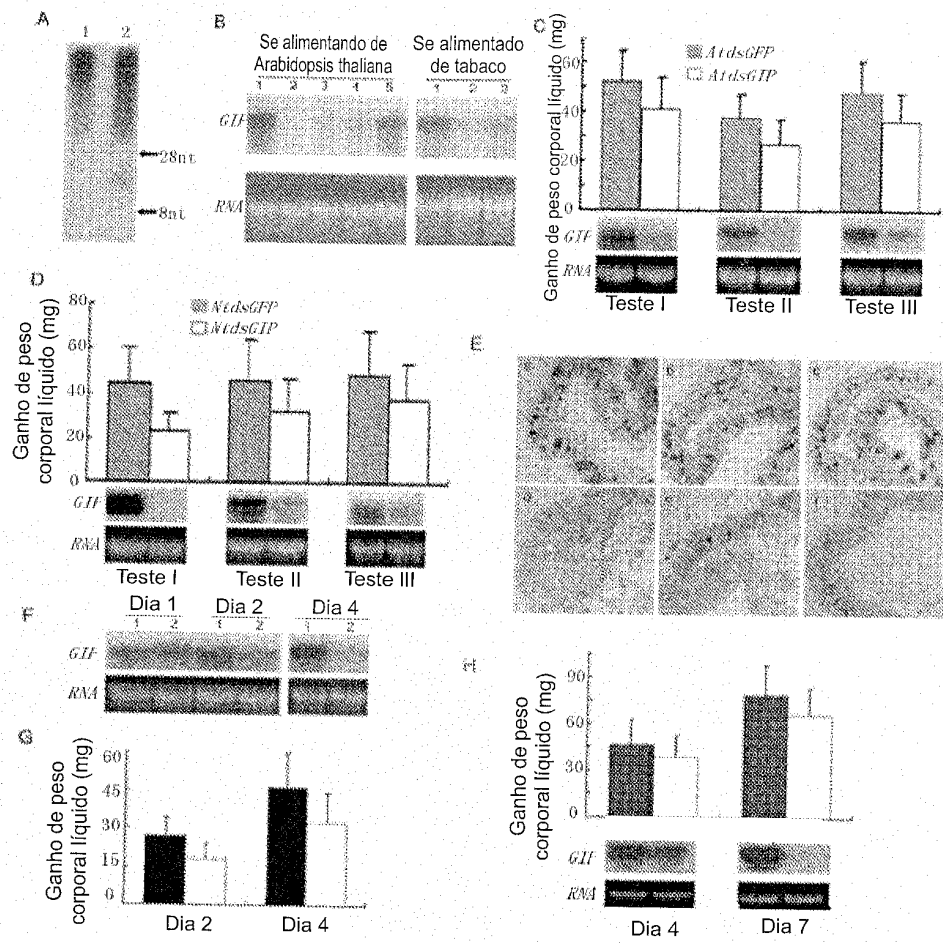


Fig. 5

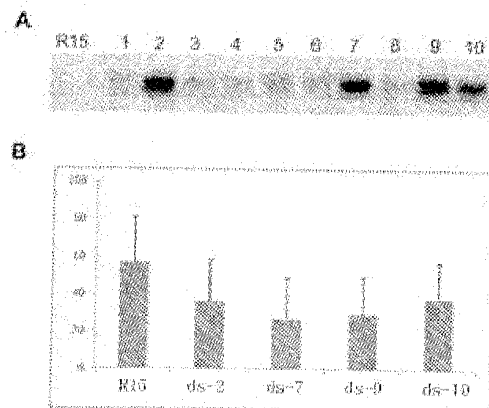


Fig. 6

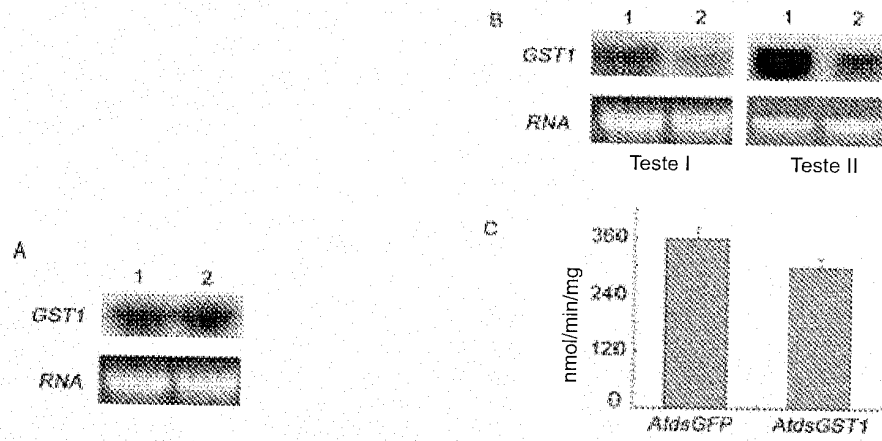


Fig. 7

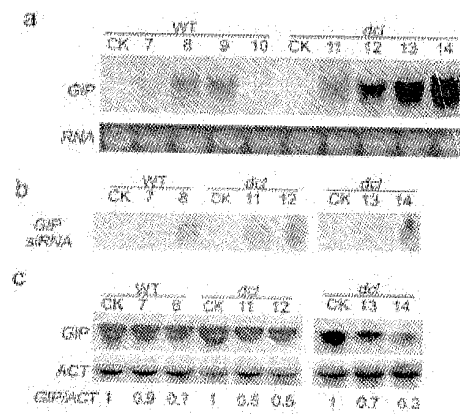


Fig. 8