

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

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



WIPO | PCT



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2014/100879 A2

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

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C12N 15/113 (2010.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2013/000608

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

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
BR 10 2012 033539 5
28 de Dezembro de 2012 (28.12.2012) BR

(71) Requerentes : EMPRESA BRASILEIRA DE
PESQUISA AGROPECUÁRIA-EMBRAPA [BR/BR];
Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Edifício Sede, Plano
Piloto, 70770-901 - Brasília - DF (BR). GROSSI DE SÁ,
Maria Fátima [AU/AU]; SCENTR 01, BI H, Apto.306,
Conj. 36, Ilhas do Lago, 70800-110 - Brasília - DF (BR).

(72) Inventores : MATTAR DA SILVA, Maria Cristina;
AOS 2 Bloco A Ap. 403 - Octogonal, 70660-021 Brasília,
DF (BR). LIMA PEPINO DE MACEDO, Leonardo;
STN, Lote K, Bloco II, apto. 204 - Ed. Montreal, Asa
Norte, 70770-100 - Brasília - DF (BR). PEREIRA
FIRMINO, Alexandre Augusto; C7, Lt7/15, Ed. Via del
Plaza, apto. 307, 72010-0760 - Taguatinga - Brasília, DF
(BR). RAMOS COELHO, Roberta; STN, Lote K, Bloco
1, Apt. 126, Asa Norte, 70770-100 - Brasília - DF (BR).
TRISTAN LOURENÇO, Isabela; SQN 104, BL D, Ap.
101, Asa Norte, 70733-40 - Brasília - DF (BR).

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

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

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

(54) Title : METHOD AND COMPOSITIONS FOR THE GENETIC CONTROL OF INSECT PESTS IN COTTON PLANTS BY CHITIN SYNTHASE GENE SILENCING

(54) Título : MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DE QUITINA SINTASES

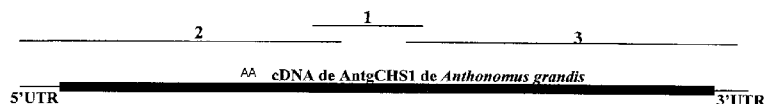


Fig. 1

AA AntgCHS1 cDNA from Anthonomus grandis

(57) Abstract : The present invention relates to the control of pest infestation by inhibiting or reducing the expression of genes of the chitin synthase family. The invention further provides pest control methods and compositions by feeding one or more double-stranded RNA molecules according to the present invention. The invention further provides a method for obtaining transgenic plants that express double-stranded RNA molecules. The present invention is preferably used for cotton plants.

(57) Resumo : A presente invenção está relacionada ao controle de infestação de praga através da inibição ou redução da expressão de genes da família da quitina sintase. A invenção provê ainda métodos e composições para o controle de pragas, através da alimentação de uma ou mais moléculas de RNA de fita dupla provida pela presente invenção. A invenção descreve ainda um método de obtenção de plantas transgênicas que expressem moléculas de RNA de fita dupla. A presente invenção é preferencialmente utilizada para plantas de algodoeiro.



WO 2014/100879 A2

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO E COMPOSIÇÕES PARA CONTROLE GENÉTICO DE INSETOS-PRAGA EM PLANTAS DE ALGODÃO ATRAVÉS DO SILENCIAMENTO DE GENES DE QUITINA SINTASES**".

5 **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se ao campo de controle de insetos-praga que atacam lavouras agrícolas, especialmente algodoeiros, através do silenciamento de genes de quitina sintases mediado por RNA dupla fita (dsRNA) expresso em plantas de algodão.

10 **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO**

A agricultura é um dos principais pilares da economia de países em desenvolvimento. No Brasil, as principais culturas produzidas são: soja, algodão, milho, feijão, café, cana-de-açúcar, entre outras. No entanto, a maioria destas culturas tem a sua produção prejudicada pela incidência de insetos-praga e doenças. As perdas na produção agrícola causadas por insetos-praga chegam a níveis elevados de mais de 37% e sabe-se que cerca de 200 doenças de plantas são causadas por fitopatógenos (HAQ, S. K., et al., Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Archives of biochemistry and biophysics, v. 431, n. 1. p. 145-159. 2004). A necessidade de controlar os insetos-praga e patógenos na agricultura tem impulsionado o desenvolvimento de diferentes pesticidas que diminuem as perdas e contribuem com o agronegócio, porém, são altamente tóxicos, não somente à espécie alvo, como também aos outros animais e até aos humanos.

25 O algodoeiro é, dentre todas as plantas domésticas e cultiváveis, uma das mais atacadas por doenças e insetos-praga, além de apresentar alta sensibilidade à ocorrência imposta por plantas daninhas (Beltrão, E. M., Souza, J. G. O agronegócio do algodão no Brasil. Embrapa: Brasília, v.01, 1999). Dentre os principais insetos-praga, destaca-se o bicudo-do-
30 algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Boheman, C. H. Description of new species. In Schoenherr, Genera et species Curculionidum cum synonymia hujus Familiae, vol. 7, pt. 2. Paris: Roret. 461p., 1843), considerado uma das pragas

mais sérias da cultura do algodão, encontrando-se dispersa no México, Cuba, Haiti, Venezuela, Colômbia, Paraguai e Brasil. Este inseto utiliza os botões florais e frutos do seu hospedeiro como fonte de alimento e local de desenvolvimento, causando prejuízos diretos à comercialização da fibra de algodão. Os níveis de infestação crescem rapidamente e os prejuízos podem atingir até 100% da produção, caso as medidas de controle não sejam adequadas. Este inseto representa um grande potencial de dano, sendo considerado praga-chave no planejamento e controle de insetos nocivos à cultura, principalmente devido à dificuldade de controle pelos inseticidas químicos.

O algodoeiro e suas pragas coexistem por um longo período evolutivo. Planta e inseto formam um sistema morfológico e bioquímico interdependente e competitivo, resultando na maioria das vezes, na utilização de parte da planta pelo inseto. Essa parte utilizada representa o dano causado pelo inseto à planta, e depende do tamanho da população da praga, e da habilidade da planta em resistir ao ataque e de se recuperar do dano sofrido (Beltrão, E. M., Souza, J. G. O agronegócio do algodão no Brasil. Embrapa: Brasília, v.01, 1999).

A interação planta versus inseto pode ser visualizada de pelo menos duas maneiras: do ponto de vista do inseto, com a planta variando de adequada a completamente inadequada como hospedeira e, por outro lado, do ponto de vista da planta onde, quanto menor o número de espécies e abundância de insetos associados a ela, e quanto menor o efeito que esses insetos exercem sobre elas, maior a sua resistência sobre esses insetos (Santos, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. Algodão: tecnologia de produção., p. 296p. 2002).

Entre um extremo e outro de resistência das plantas aos insetos-praga, existe um completo e extensivo arsenal de mecanismos de ataque e contra-ataque a ação dos insetos, que vão desde um simples impedimento morfológico a complexos componentes fitoquímicos, que interferem diretamente no processo metabólico envolvido na utilização da planta como hos-

pedeira do inseto. Em termos práticos, a resistência do algodoeiro aos insetos-praga representa a habilidade de certas cultivares produzirem algodão de melhor qualidade em maior quantidade que outros cultivares, sob ataque da mesma população de insetos-praga (Freire, E. C. Cultivares e produção de semente na melhoria da qualidade do algodão no nordeste e centro-oeste do Brasil. Boletim informativo Embrapa/ CNPA. 1997).

Atualmente, tem surgido uma necessidade para o desenvolvimento de métodos mais seletivos, sem ação sobre o meio ambiente, não persistentes e biodegradáveis e que se adaptem bem a programas de controle de insetos-praga.

Devido aos perigos associados ao controle químicos de insetos, diversas abordagens moleculares para o controle de pragas em plantas foram desenvolvidas. A mais de trinta anos a utilização do *Bacillus thuringiensis*, vem se mostrando uma alternativa segura, e cada vez mais suas entomotóxicas são transferidas para variedades comerciais. Campos plantados com as variedades transgênicas apresentam uma redução drástica na utilização de inseticidas em todo o mundo, o que adicionalmente causa uma diminuição de casos de envenenamento e também um aumento no número de insetos benéficos nas plantações.

Atualmente, o RNA interferente, apresenta-se como uma ferramenta com grande potencial para o combate de insetos pragas, tendo em vista sua especificidade, e alta eficiência na supressão do mRNA alvo.

O mecanismo de RNA interferente (RNAi) é um fenômeno que ocorre naturalmente nas células e em diversos organismos eucarióticos. Tal processo, descrito primeiramente em plantas, foi denominado como silenciamento gênico pós-transcricional, ou PTGS (NAPOLI, C., et al., Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in Trans. Plant Cell, v. 2, n. 4. p. 279-289. 1990). No entanto, a primeira descrição de silenciamento gênico em animais, assim como sua melhor compreensão, foi obtida em *Caenorhabditis elegans*, nematóide de vida livre e organismo modelo (FIRE, A., et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in

Caenorhabditis elegans. Nature, v. 391, n. 6669. p. 806-811. 1998). Atualmente sabe-se que esse processo participa de forma integral na regulação da expressão gênica em várias plantas e outros eucariotos (LILLEY, C. J., et al., Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. Molecular Plant Pathology, v. 8, n. 5. p. 701-711. 2007).

Seu mecanismo de ação baseia-se principalmente na introdução de um RNA dupla fita em um organismo alvo, por microinjeção ou ingestão (FIRE, A., et al., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, v. 391, n. 6669. p. 806-811. 1998).
Esse RNA dupla fita inicia um processo de silenciamento gênico pós-transcricional, através da degradação de mRNAs homólogos, causando uma diminuição na síntese da proteína correspondente (MEISTER, G.; TUSCHL, T., Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature, v. 431, n. 7006. p. 343-349. 2004), dificultando a sobrevivência ou até mesmo levando o parasito a morte.

Desde a sua descrição inicial a técnica transformou-se em uma ferramenta valiosa para a genômica funcional de insetos, em particular no estudo de função gênica em *Drosophila melanogaster* (MESQUITTA, L.; PATERSON, B. M., Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 96, n. 4. p. 1451-1456. 1999; KENNERDELL, J. R.; CARTHEW, R. W., Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. Nat Biotechnol, v. 18, n. 8. p. 896-898. 2000). Trabalhos recentes mostraram a viabilidade de plantas que produzem dsRNA na resistência contra insetos pragas. Essas plantas transgênicas produzem dsRNA específicos contra genes essenciais no trato digestivo dos insetos causando mortalidade em 24h depois do contato com o RNAi (BAUM, J. A., et al., Control of coleopteran insect pests through RNA interference. Nat Biotechnol, v. 25, n. 11. p. 1322-1326. 2007; MAO, Y. B., et al., Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. Nat Biotechnol, v. 25, n. 11. p. 1307-1313. 2007).

A aplicação de RNAi *in planta* tem um grande potencial como uma abordagem para o manejo de insetos. A especificidade do RNAi para fins inseticidas é uma consideração importante para o uso desta tecnologia em aplicações práticas, já que os efeitos sobre insetos não-alvo podem ser minimizados. Dentre outras vantagens, esta técnica permite o uso de apenas fragmentos de sequências, tendo em vista que a tradução de uma proteína não é necessária, o que minimiza as preocupações com biossegurança e alergenicidade, e representa uma forma de controle provavelmente mais eficaz do que as atuais.

A quitina, um polissacarídeo linear formado por resíduos de N-acetil-D-glicosamina unidos por ligações β (1-4), é amplamente difundida entre os insetos, os quais utilizam este versátil biopolímero em várias estruturas anatômicas. As duas principais estruturas extracelulares onde ocorre a deposição de quitina são a cutícula que reveste a epiderme e a membrana peritrófica que recobre o intestino médio. (MUTHUKRISHNAN, S., et al., Chitin Metabolism in Insects. In *Insect Molecular Biology and Biochemistry*, 1 ed.; Gilbert, L. I., Ed. Elsevier: London, pp 193-225. 2012).

A membrana peritrófica é uma estrutura funcional que recobre o intestino médio dos insetos. As principais funções atribuídas a esta membrana são a de proteção mecânica contra injúria as células do intestino médio (WIGGLESWORTH, V., *The principles of insect physiology*. 7 ed.; Chapman and Hall: London, Vol. p 827. 1972), uma barreira física contra microorganismos (PETERS, W., *Peritrophic membranes*. Springer-Verlag New York, Vol. 1992), uma barreira seletiva para enzimas digestivas e produtos de digestão (DAY, M. F.; WATERHOUSE, D. F., *Functions of the alimentary system*. John Wiley: New York, Vol. p 299-310. 1953) e atuação no mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas, fenômeno conhecido como circulação ectoendoperitrófica (TERRA, W. R., *Physiology and Biochemistry of Insect Digestion - an Evolutionary Perspective*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 21, n. 4. p. 675-734. 1988; TERRA, W. R.; FERREIRA, C., *Insect Digestive Enzymes - Properties, Compartmentalization and Function*. Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry

& Molecular Biology, v. 109, n. 1. p. 1-62. 1994; TERRA, W. R., The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 47, n. 2. p. 47-61, 2001).

A cutícula de insetos ou exoesqueleto é uma estrutura multifuncional, que serve de suporte físico, como também lhe dá a sua forma, possibilita a locomoção, confere a impermeabilização do corpo, e uma gama de especializações mecânicas localizadas, como elevado grau de adesão, resistência ao desgaste e controle de difusão. Nesta estrutura, suas propriedades mecânicas são atribuídas ao seu principal constituinte, a quitina (VINCENT, J. F., et al., Design and mechanical properties of insect cuticle. Arthropod Struct Dev, v. 33, n. 3. p. 187-199. 2004).

A síntese e a deposição de quitina na cutícula e na membrana peritrófica compreendem uma série sequencial de complexas transformações bioquímicas, biofísicas, intracelulares e extracelulares, algumas das quais ainda pouco entendidas (MOUSSIAN, B., et al., Assembly of the Drosophila larval exoskeleton requires controlled secretion and shaping of the apical plasma membrane. Matrix Biol, v. 26, n. 5. p. 337-347. 2007). Por estar ausente em plantas e vertebrados, a via biossintética da quitina é um dos principais alvos para o desenvolvimento de inseticidas, desde 1970 (VERLOOP, A., et al., Benzoylphenyl Ureas - A New Group of Larvicides Interfering with Chitin Deposition. In Pesticide Chemistry in the 20th Century, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY: Vol. 37, pp 237-270. 1977). Dentre as enzimas envolvidas na síntese de quitina em insetos, enfoque especial tem sido dado à última etapa da via que é mediada pela enzima quitina sintase (EC 2.4.1.16), a qual catalisa a polimerização da quitina a partir de monômeros ativados de UDP-N-acetilglicosamina (MERZENDORFER, H., The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. Eur J Cell Biol, v. 90, n. 9. p. 759-769. 2011).

A interrupção ou a diminuição da síntese de enzimas que participam da biossintese de constituintes da cutícula e da membrana peritrófica dos insetos por meio da tecnologia do RNAi apresenta-se como uma forma específica de controle de insetos pragas.

A quitina sintase A (ou tipo 1) em insetos é a principal enzima envolvida na biossíntese de quitina da cutícula e da traqueia, no entanto, a quitina sintase B (ou tipo 2) em insetos é a principal enzima envolvida na biossíntese de quitina da membrana peritrófica, ambas quitinas sintases de insetos tem sido estudadas como alvos ideais para o desenvolvimento de estratégias de controle de insetos-praga.

Na presente invenção é mostrado o efeito inseticida de moléculas de dsRNA sobre o bico do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, a principal praga da cotonicultura do Brasil. O efeito inseticida é atribuído à inibição dos níveis de transcritos das enzimas quitina sintase 1 e 2, que ocasionou danos ao desenvolvimento de ovos e adultos de *A. grandis* quando submetidos ao tratamento de dsRNA contra estas enzimas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada com um método para reduzir ou inibir a expressão de genes envolvidos na biossíntese de quitina em células eucarióticas, particularmente em células animais, resultando na morte, inibição, atrofia ou interrupção de alimentação de uma praga alvo.

Em uma concretização a invenção descreve moléculas de ácido nucleicos substancialmente similares às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas. A invenção descreve moléculas de dsRNA, a partir das sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, ou fragmentos ou complementos destas ou fragmento ou complemento desta, estabilizada ou a expressão de um ou mais microRNAs (miRNA) ou siRNAs para inibição da expressão de um gene-alvo, em coleóptero-praga, expressado destas sequências e fragmentos das mesmas.

A invenção descreve ainda composições contendo moléculas de ácido nucleico substancialmente similar às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, ou fragmentos ou complementos destas, para o

controle de insetos-praga, particularmente o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*).

A invenção provê também um método para supressão de expressão gênica em um coleóptero-praga, como o bicudo-do-algodoeiro ou espécie correlata, que compreende a etapa de fornecimento na dieta da praga de uma quantidade supressora do gene, contando com pelo menos uma molécula de dsRNA, transcrita de uma sequência de nucleotídeos substancialmente similar às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, ou fragmentos ou complementos destas, que tenha pelo menos um fragmento complementar de uma sequência do mRNA no interior das células da praga.

São também aspectos da invenção, genes quiméricos, construções gênicas contendo as moléculas de ácido nucleico da presente invenção, vetores de transformação e expressão, células e organismos transgênicos, métodos para a expressão da molécula da presente invenção em organismos transgênicos, bem como o uso das mesmas no controle de pragas. A invenção compreende, também, um método para obtenção de uma planta transgênica utilizando as construções gênicas da presente invenção e um método de produção de comida ou alimento, compreendendo a obtenção de uma planta transformada com polinucleotídeos contendo uma sequência de nucleotídeos substancialmente similar às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, ou fragmentos ou complementos destas, e o preparo de comida ou alimento a partir da referida planta ou parte da mesma.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1 – Estratégia de clonagem do cDNA de AntgCHS1. A sequência completa do cDNA de AntgCHS1 foi determinada pela sobreposição de 3 fragmentos de PCR.

Figura 2 – Estratégia de clonagem do cDNA de AntgCHS2. A sequência completa do cDNA de AntgCHS2 foi determinada pela sobreposição de 4 fragmentos de produtos de PCR.

Figura 3 – Análise da expressão relativa de transcritos do gene *AntgCHS1* em ovos de *A. grandis* por qPCR. β -actina e GAPDH foram utilizados como genes de referência. A expressão relativa (UA) foi calculada com base no valor de expressão para o tratamento de dsRNA *AntgCHS1*, a qual foi atribuído um valor arbitrário de 1. Diferentes letras sobre as barras indicam diferença significativa da expressão entre os tratamentos baseado em duas replicas biológicas ($P < 0,05$, teste-T). Nos tratamentos cada inseto foi microinjetado com 200 ng de dsRNA GUS (controle) e 200 ng de dsRNA *AntgCHS1*.

Figura 4 - Efeito do dsRNA de *AntgCHS1* sobre a oviposição de ovos de *A. grandis*. A. Efeito do dsRNA de *AntgCHS1* sobre a viabilidade de ovos de *A. grandis*; B. Ovos inviáveis provenientes de fêmeas microinjetadas com dsRNA de *AntgCHS1*. Nos tratamentos cada inseto foi microinjetado com 200 ng de dsRNA GUS (controle) e 200 ng de dsRNA *AntgCHS1*.

Figura 5 - Efeito do dsRNA de *AntgCHS1* sobre larvas neonatas provenientes de insetos adultos microinjetados de *A. grandis*. A. Larvas provenientes de adultos microinjetados com dsRNA de *AntgCHS1*; B detalhe de larva controle provenientes de adultos microinjetados com dsRNA GUS (controle), C e D detalhe de larvas de 1º instar com mal formações na cápsula cefálica.

Figura 6 - Efeito do dsRNA *AntgCHS1* sobre o desenvolvimento de *A. grandis*. A microinjeção do dsRNA *AntgCHS1* foi realizada em larvas de 3º instar. Após microinjeção as larvas foram transferidas para dieta artificial para completarem o seu desenvolvimento. Após 10 dias a morfologia dos insetos foi avaliada.

Figura 7 - Análise da expressão relativa de transcritos de *AntgCHS2* após microinjeção de diferentes segmentos de dsRNA- genes de referência GAPDH e beta-actina. 1. Controle consistiu da administração de H₂O; 2. dsRNA GUS - consistiu da administração de um dsRNA com a sequência de 350 pb do gene gus; 3. dsRNA *AntgCHS2.1* (SEQ ID Nº 4); 4. dsRNA *AntgCHS2.2* (SEQ ID Nº 5); 5. dsRNA *AntgCHS2.3* (SEQ ID Nº 6).

Figura 8 - Análise da expressão relativa de transcritos por PCR

em tempo real de AntgCHS2 depois da microinjeção de diferentes concentrações de dsRNA AntgCHS2.3 (SEQ ID N° 6) em insetos adultos de *A. grandis* após 48hs.

Figura 9 - Análise da expressão relativa de transcritos por PCR em tempo real de AntgCHS2 depois da microinjeção de diferentes concentrações de dsRNA AntgCHS2.3 (SEQ ID N° 6) em larvas de *A. grandis* após 72hs.

Figura 10 - Análise da persistência do silenciamento de AntgCHS2 após o desenvolvimento larval de *A. grandis* por PCR em tempo real. A microinjeção de dsRNA AntgCHS2.3 (SEQ ID N° 6) foi realizada em larvas e o silenciamento foi analisado em insetos adultos de *A. grandis* após 72hs da emergência.

Figura 11 - Efeito da microinjeção de dsRNA AntgCHS2.3 (SEQ ID N° 6) sobre a oviposição de fêmeas *A. grandis*. No tratamento controle foi realizada a administração de dsRNA GUS; A. análise da quantidade de ovos/fêmea/dia; B. Análise da oviposição do número de ovos totais. Nos tratamentos cada inseto foi microinjetado com 200 ng de dsRNA GUS (controle) e 200 ng de dsRNA AntgCHS2.3.

Figura 12 - Efeito da microinjeção de dsRNA AntgCHS2.3 (SEQ ID N° 6) sobre a sobrevivência de fêmeas de *A. grandis*. Nos tratamentos cada inseto foi microinjetado com 200 ng de dsRNA GUS (controle) e 200 ng de dsRNA AntgCHS2.3.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve métodos e composições para o controle de pragas, especialmente pragas de algodão. Por exemplo, a presente invenção fornece tecnologias de DNA recombinante para reprimir ou inibir pós-transcricionalmente a expressão de uma sequência alvo na célula de uma praga. Esse efeito é obtido através da alimentação, para uma ou mais pragas, de cadeia dupla de RNA ou de fragmentos de RNA (miRNA ou siRNA) transcritos a partir de toda ou uma parte de uma sequência alvo que codifica, controlando assim a infestação. Por conseguinte, a presente invenção refere-se a sequências específicas de inibição da expressão de se-

quências de codificação, utilizando RNA de cadeia dupla (dsRNA), incluindo pequeno RNA interferente (siRNA), para atingir os níveis pretendidos de controle de pragas.

A presente invenção proporciona um método de inibição da expressão de um gene alvo em coleópteros. Em certas formas de realização, o método compreende a modulação ou inibição da expressão de um ou mais genes-alvo de coleópteros que faz com que ocorra inibição do desenvolvimento, reprodução e/ou infeciosidade e, eventualmente, resulte na morte do inseto. Mais especificamente a presente invenção está relacionada à inibição dos genes da família da quitina sintase em coleópteros, resultando na interrupção do desenvolvimento e má formação de insetos larvas e adultos, podendo resultar na morte do inseto. O método compreende a introdução de RNA dupla fita (dsRNA) de forma parcial, estabilizado, incluindo as suas formas modificadas, tais como sequências de pequeno RNA interferente (siRNA), dentro das células ou em meio extracelular, tal como o intestino médio, dentro de coleópteros em que o dsRNA entra nas células e inibe a expressão de pelo menos um ou mais genes alvo, e onde a inibição exerce um efeito deletério sobre a praga. Os métodos e as composições associadas podem ser utilizados para limitar ou eliminar a infestação de coleópteros ou em qualquer hospedeiro de pragas, praga simbiote, ou ambiente no qual a praga está presente através de uma ou mais composições que compreendem a molécula de dsRNA aqui descrita na dieta das pragas.

A presente invenção proporciona ainda exemplos de composições de ácido nucleico que são homólogas a pelo menos uma porção das sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, ou fragmentos ou complementos destas. Um exemplo específico de tais ácidos nucleicos proporcionados pela invenção está descrito nas SEQ ID NO 2 e SEQ ID NO 6 ou seus complementos.

Em ainda outro aspecto, a invenção proporciona um método para a supressão da expressão do gene de uma praga coleópteros, tais como bicudo-do-algodoeiro ou de espécies relacionadas, que compreende o pas-

so de proporcionar na dieta da praga de uma quantidade gene supressor de pelo menos um dsRNA molécula transcrita a partir de uma sequência nucleotídica tal como aqui descrito, pelo menos, um segmento do qual é complementar a uma sequência miRNA dentro das células da praga. O método pode ainda compreender a morte, nanismo, ou cessação da alimentação da praga. Uma molécula de dsRNA, incluindo a sua forma modificada tal como uma molécula de siRNA, alimentada a uma praga de acordo com o invento pode ser de pelo menos de cerca de 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ou cerca de 100% de identidade com uma molécula de RNA transcrita a partir das sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas.

A presente invenção proporciona ainda uma molécula de dsRNA estabilizada ou a expressão de um ou mais miRNAs para a inibição da expressão de um gene alvo numa praga coleóptera expressa a partir desta sequência e os seus fragmentos. Um dsRNA estabilizada, incluindo uma molécula de siRNA miRNA ou pode compreender pelo menos duas sequências de codificação que são dispostos em um sentido e uma orientação anti-sentido em relação a pelo menos um promotor, em que a sequência de nucleótidos que compreende uma cadeia com sentido e uma cadeia anti-sentido está relacionada ou ligada por uma sequência espaçadora de, pelo menos, a partir de cerca de três a cerca de dez mil nucleotídeos, em que a cadeia com sentido e a cadeia anti-sentido podem ser formadas de comprimentos diferentes, e cada uma das duas partes codificam sequências de pelo menos 80% de identidade de sequência, pelo menos, 90 %, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou 100% de identidade de sequência, a qualquer sequência de um ou mais nucleótido (s) de acordo com as sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas.

Além disso, a invenção fornece ainda um fragmento ou concatêmero de uma sequência de ácido nucleico selecionada a partir das sequên-

cias selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas. O fragmento pode ser definido como causando morte, ou prejudicando o desenvolvimento de um organismo nocivo quando expresso como um dsRNA e fornecido para a praga. O fragmento pode, por exemplo, compreender pelo menos cerca de 19, 21, 23, 25, 40, 60, 80, 100, 125 ou mais nucleotídeos contíguos das sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, ou fragmentos ou complementos destas, ou um seu complemento. Um segmento de DNA benéfico para uso no presente invento é pelo menos 19 a cerca de 23, ou cerca de 23 até cerca de 100 nucleotídeos até cerca de 2000 nucleotídeos de comprimento ou mais. Particularmente útil para a presente invenção são sequências de DNA, incluindo cerca de 19 a cerca de 400 nucleotídeos homólogos a uma sequência alvo de pragas. A invenção proporciona também um ácido ribonucleico expresso a partir de qualquer de tais sequências, incluindo um dsRNA. A sequência selecionada para utilização na expressão de um agente de supressão de gene pode ser construída a partir de uma única sequência derivada de uma ou mais pragas alvo e destinada a ser utilizada na expressão de um RNA que funciona na supressão de um único gene ou família de genes em uma ou mais pragas alvo, ou a sequência de DNA pode ser construída como uma quimera de uma pluralidade de sequências de DNA. Especificamente para a presente invenção essa família de genes está relacionada à família dos genes da quitina sintase, especificamente à quitina sintase 1 e quitina sintase 2.

Em ainda outro aspecto, o invento proporciona construções de DNA recombinante que compreende uma molécula de ácido nucleico que codifica uma molécula de dsRNA aqui descrita. O dsRNA pode ser formado por uma fita de transcrição da molécula de uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos de cerca de 80% a cerca de 100% idêntica às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, ou fragmentos ou complementos destas. Tais construções de DNA recombinante podem ser definidas

como a produção de moléculas de dsRNA, capazes de inibir ou reduzir a expressão do gene alvo endógeno (s) numa célula praga após a ingestão. A construção pode incluir uma sequência nucleotídica do invento operativamente ligado a uma sequência de promotor que funciona na célula hospedeira. A presente invenção pode se utilizar de promotores tecido-específicos ou constitutivos. Preferencialmente para a presente invenção os promotores tecido-específicos podem ser, mas não estão limitados a, promotores específicos para botões florais de plantas de algodão.

Construções de ácido nucleico de acordo com a invenção podem compreender pelo menos uma sequência de nucleótidos que não ocorre naturalmente e que pode ser transcrita em um RNA de cadeia simples, capazes de formar uma molécula de dsRNA in vivo por meio de hibridização. Tais sequências de dsRNA podem ser fornecidas na dieta de uma praga de coleópteros para alcançar a inibição desejada. Preferencialmente para a presente invenção a molécula de dsRNA é formada por sequências de nucleotídeos substancialmente similares às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas.

Uma construção de DNA recombinante pode conter sequências substancialmente similares às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas. Os dsRNAs podem expressar a partir de construções introduzidas em vários eventos de transformação diferentes, ou podem ser introduzidos numa única molécula de ácido nucleico. Os dsRNAs podem ser expressos utilizando um único promotor ou promotores múltiplos. Em um aspecto, a invenção proporciona uma célula hospedeira recombinante ter no seu genoma pelo menos uma sequência de DNA recombinante que é transcrito para produzir pelo menos uma molécula de dsRNA, que funciona quando ingeridos por uma praga de coleópteros para inibir ou reduzir a expressão de um gene alvo em uma praga. A molécula de dsRNA pode ser codificada pelas sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ

ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas. A presente invenção também proporciona uma célula vegetal transformada tendo no seu genoma pelo menos uma sequência de DNA recombinante aqui descrita. As plantas transgênicas que compreendem um tal célula de planta transformada são também fornecidas, incluindo as plantas de progênie de qualquer geração, as sementes, e produtos vegetais, cada uma compreendendo o DNA recombinante.

Os métodos e composições da presente invenção podem ser aplicados a qualquer planta monocotiledônea e dicotiledônea, dependendo do controle de pragas de coleópteros desejado. Assim, a presente invenção descreve uma planta transformada com uma sequência de DNA recombinante, como descrito as sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos, ou concatâmeros ou complementos destas, que é transcrito para produzir pelo menos uma molécula de dsRNA, que funciona quando ingerido por uma praga de coleópteros para inibir ou reduzir a expressão de um gene alvo.

A invenção proporciona também combinações de métodos e composições para controlar infestações de pragas de coleópteros. Um meio de fornecer um método dsRNA como aqui descrito para a protecção de plantas contra a infestação de insetos é em conjunto com um ou mais agentes insecticidas que exibem características diferentes das exibidas pelos métodos e composições de dsRNA. Por exemplo, uma ou mais proteínas de Bt pode ser fornecida na dieta das pragas de insetos, em combinação com um ou mais dsRNAs tal como aqui descrito. A composição formulada para aplicação tópica ou derivada utilizando uma abordagem transgênica, que combina os métodos e as composições de dsRNA com Bt pode ser utilizada para criar sinergias que não eram conhecidos anteriormente na arte para controlar a infestação de insetos. Uma sinergia é a redução no nível de expressão necessária para o dsRNA (s) ou a proteína de Bt (s). Quando combinadas, a menor dose eficaz de cada um dos agentes de controle de pragas pode ser usada. Acredita-se que as proteínas de Bt insecticidas crie poros

de entrada através dos quais as moléculas de dsRNA são capazes de penetrar de forma mais eficaz em espaços remotos a partir do intestino da praga de insetos, ou de forma mais eficiente para as células na proximidade das lesões criadas pela proteína Bt, requerendo assim menos quantidade de Bt ou dsRNA para atingir o resultado desejado de ação inseticida ou a inibição desejada ou supressão de uma função biológica específica na praga alvo.

A presente invenção proporciona portanto uma composição que contenha dois ou mais diferentes agentes pesticidas tóxicos para a mesma praga ou espécies de insetos onde, pelo menos, um dos quais compreende um dsRNA aqui descritos. Em certas concretizações, o segundo agente pode ser um agente selecionado a partir do grupo que consiste de uma patatina, uma proteína inseticida de *Bacillus thuringiensis*, uma proteína *Xenorhabdus* inseticida, uma proteína *Photorhabdus* inseticida, uma proteína de *Bacillus laterosporous* inseticida, uma proteína de *Bacillus sphaericus* inseticida, enzimas da família de quitinase e uma lignina. Uma proteína de *Bacillus thuringiensis* inseticida pode ser qualquer uma de uma série de proteínas inseticidas, incluindo, mas não limitado a CryI, Cry8, Cry10, Cry35 TIC851, CryET70, Cry225 TIC901, TIC1201, TIC407, TIC417, proteína inseticida CryET33 e binário CryET34, proteína binária inseticida CryET80 e CryET76, proteína inseticida binária TIC100 e TIC101, binário inseticida da proteína PS 149BI, proteína VIP inseticida, proteína TIC900 ou afins, ou combinações das proteínas inseticidas ET29 ou ET37 com proteínas inseticidas TIC810 ou TIC812 e quimeras inseticidas de qualquer uma das proteínas anteriores.

Um ácido ribonucleico, que é fornecido na dieta, pode ser fornecido em uma dieta artificial formulada para satisfazer as necessidades nutricionais especiais para determinada praga. A dieta também pode ser uma célula recombinante transformada com uma sequência de DNA construída para a expressão do agente alvo, o RNA ou o agente de supressão de gene. Após a ingestão de uma ou mais células transformadas pela praga, o resultado desejado é fenotipicamente observado, indicando que o agente foi utilizado para inibir ou reduzir a expressão de uma sequência nucleotídica alvo

que está dentro das células da praga.

Um gene alvo pode codificar para a supressão de uma proteína essencial. Para a presente invenção o gene alvo é da família da quitina sintase cuja função é a constituição da formação do cutícula, traquéia e quitina da membrana peritrófica. Portanto, a inibição ou redução da expressão de tal gene poderá afetar funções essenciais para sobrevivência do inseto a ser selecionada do grupo de diferenciação e desenvolvimento da cutícula, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, digestão e assimilação de nutrientes, proteção contra patógenos.

Um outro aspecto da presente invenção é fornecer um método para melhorar o rendimento de uma planta submetida a infestação de pragas de insetos, compreendendo o referido método os passos de: a) introdução de um polinucleotídeo compreendendo uma sequência substancialmente similar às sequências selecionadas do grupo consistindo de SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 e SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 e SEQ ID N° 6 ou fragmentos ou complementos destas ou concatâmeros na referida planta, e b) cultivar a planta de modo a permitir a expressão da referida característica.

Ainda outro aspecto da invenção proporciona produtos agrônomicos e comercialmente importantes e/ou composições de matéria, incluindo, mas não limitado a, alimentos para animais, produtos de base, produtos e subprodutos que se destinam a serem utilizados como alimentos para consumo humano ou para utilização nas composições e produtos que se destinam ao consumo humano, incluindo, mas não se limitando à farinha de algodão, óleo de algodão, bolos de algodão, pluma de algodão, fibra de algodão, cereais, e assim por diante. Tais composições podem ser definidas como contendo uma quantidade detectável de uma sequência de nucleotídeos aqui estabelecidos, e, assim, também são diagnósticos para qualquer acontecimento transgênico contendo tais sequências de nucleotídeos. Estes produtos são úteis, pelo menos, porque eles são susceptíveis de ser obtidos a partir de culturas propagadas com menos pesticidas organofosforados e como um resultado da sua incorporação dos nucleotídeos da presente invenção para controlar a infestação de pragas de coleópteros em plantas.

Tais mercadorias e produtos de base podem ser produzidos a partir de sementes produzidas a partir de uma planta transgênica, em que a planta expresse RNA a partir de um ou mais nucleotídeos contíguos da presente invenção ou nucleotídeos de uma ou mais pragas de coleópteros e respectivos complementos.

Um método de produção de um produto deste tipo compreende a obtenção de uma planta transformada com um polinucleotídeo compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas ou concatâmero das mesmas, e preparação de um produto de base a partir da planta ou parte da mesma também é fornecido na presente invenção. Além disso, um método de produção de alimentação humana ou animal, que compreende a obtenção de uma planta transformada com um polinucleotídeo compreendendo uma sequência selecionada do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou um fragmento ou concatâmero ou complemento da mesma, e preparar o alimento ou alimento para animais a partir da referida planta ou parte deste é ainda um outro aspecto da invenção.

A invenção também fornece um meio legível por computador tendo nele registado uma sequência selecionada do grupo consistindo de SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3 e SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 ou fragmentos ou complementos destas ou concatâmero das mesmas, para utilização num certo número de aplicações de computador, incluindo, mas não se limitando a identidade de DNA e busca de similaridade, identidade e pesquisa de similaridade de proteína, caracterizações de perfis de transcrição, comparações entre genomas, e análises de hibridação artificiais.

No contexto dessa descrição, inúmeros termos serão utilizados e por isso serão melhor detalhados a seguir.

O termo "ácido nucleico" refere-se a uma grande molécula a qual pode ser fita simples ou fita dupla, composta de monômeros (nucleotídeos)

contendo um açúcar, um fosfato e uma base purina ou pirimidina. Um “fragmento de ácido nucleico” é uma fração de uma dada molécula de ácido nucleico. “Complementaridade” refere-se ao pareamento específico de bases purinas e pirimidinas que consistem de ácidos nucleicos: pares de adenina com timina e pares de guanina com citosina. Então, o “complemento” de um primeiro fragmento de ácido nucleico refere-se ao segundo fragmento de ácido nucleico cuja sequência de nucleotídeos é complementar à primeira sequência de nucleotídeos.

Em plantas mais desenvolvidas, ácido desoxirribonucleico (DNA) é o material genético enquanto ácido ribonucleico (RNA) está envolvido na transferência da informação do DNA em proteínas. Um “genoma” é toda parte principal do material genético contida em cada célula de um organismo. O termo “sequência de nucleotídeo” refere-se às sequências de polímeros de nucleotídeos, formando uma fita de DNA ou RNA, as quais podem ser simples ou dupla-fita, opcionalmente sintéticas, não naturais ou com bases de nucleotídeos alteradas capazes de incorporação dentro de polímeros de DNA ou RNA. O termo “oligômero” refere-se a sequências curtas de nucleotídeos, usualmente até 100 bases de comprimento. O termo “homólogo” à ligação entre as sequências de nucleotídeos de duas moléculas de ácido nucleico ou entre as sequências de aminoácidos de duas moléculas de proteínas. A estimativa de tal homologia é provida através da hibridização de DNA-DNA ou RNA-RNA sob condições de estringência como definido no estado da técnica (como mencionado no documento US20030074685, Hames and Higgins, Ed. (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, U.K); ou pela comparação de similaridade de sequência entre duas moléculas de ácido nucleico ou proteína (como mencionado no documento US20030074685, Needleman et al., *J. Mol. Biol.* (1970) 48:443-453).

“Gene” refere-se ao fragmento de nucleotídeo que expressa uma proteína específica, incluindo sequências regulatórias precedentes (região 5’ não traduzida) e posteriores (região 3’ não traduzida) à região codificadora. “Gene nativo” refere-se a um gene isolado com sua própria sequência reguladora encontrada na natureza. “Gene quimérico” refere-se ao gene que

compreende sequências codificadoras, regulatórias e heterogêneas não encontradas na natureza. O gene quimérico da presente invenção compreende moléculas isoladas de ácido nucleicos, na orientação sense ou antisense, ligadas operacionalmente a promotores ativos. Construções gênicas da presente invenção podem conter 1 ou mais genes quiméricos e podem ou não apresentar íntrons. “Gene endógeno” refere-se ao gene nativo normalmente encontrado em sua localização natural no genoma e não é isolado. Um “gene exógeno” refere-se a um gene que não é normalmente encontrado no organismo hospedeiro, mas que é introduzido por transferência gênica.

5 “Pseudogene” refere-se a uma sequência nucleotídica que não codifica uma enzima funcional.

“Sequência codificadora” refere-se à sequência de DNA que codifica uma proteína específica e exclui a sequência não codificadora. Uma “sequência codificadora interrompida” significa a sequência que atua como

15 separadora (por exemplo, um ou mais íntrons ligados através de junções). Um “íntron” é uma sequência de nucleotídeo que é transcrita e está presente no pré mRNA, mas é removida através de clivagem e a re-ligação do mRNA dentro da célula gerando um mRNA maduro que pode ser traduzido em uma proteína. Exemplos de íntrons incluem, mas não são limitados a,

20 íntron pdk2, íntron catalase da mamona, íntron Delta 12 desnaturase de algodão, Delta 12 desnaturase de Arabidopsis, íntron ubiquitina de milho, íntron de SV40, íntrons do gene da malato sintase.

“Transcrito de RNA” refere-se ao produto resultante da transcrição catalisada pela RNA polimerase de uma sequência de DNA. Quando o

25 transcrito de RNA é uma cópia perfeita da sequência de DNA, ele é referido com transcrito primário ou ele pode ser uma sequência de RNA derivada de um processo pós-transcricional do transcrito primário e é então referido como transcrito maduro. “RNA mensageiro (mRNA)” refere-se ao RNA que está sem íntrons. “RNA sense” refere-se a um transcrito de RNA que inclui o

30 mRNA. “RNA antisense” refere-se a um transcrito de RNA que é complementar a todas as partes de um transcrito primário ou mRNA e que pode bloquear a expressão de um gene alvo através da interferência no proces-

samento, transporte e/ou tradução do seu transcrito primário ou mRNA. A complementaridade de um RNA antisense pode ser com qualquer parte do transcrito gênico específico, isto é, sequência 5' não traduzida, sequência 3' não traduzida, íntrons ou sequência codificadora. Além disso, o RNA antisense pode conter regiões de sequências ribozima que aumentam a eficácia do RNA antisense para bloquear a expressão gênica. "Ribozima" refere-se ao RNA catalítico e inclui sequências específicas de endoribonucleases. "DsRNA (dupla-fita)" refere-se a estrutura em grampo formada entre a sequência do mRNA ou RNA sense, a sequência de uma região espaçadora e a sequência do RNA antisense. "Região espaçadora" refere-se à sequência de nucleotídeo que não está relacionada com a sequência do gene alvo, como a sequência de um íntron.

O termo "vetor" diz respeito a um replicon, como plasmídeo, fago ou vírus, no qual outras sequências genéticas ou elementos (sejam eles de DNA ou RNA) podem ser ligados. Desta forma, os genes podem ser replicados juntamente com o vetor. Preferencialmente um dos vetores de interesse da presente invenção diz respeito ao fagomídeo. O termo "fagomídeo" diz respeito a um vetor que contém sequência para replicação em fago e em bactéria, este vetor tem características que atendem as especificações da célula hospedeira bem como agentes selecionadores e promotores. O termo "vetor recombinante" é resultante da combinação de um vetor comercial com moléculas de ácido nucleico da presente invenção operacionalmente ligadas a um promotor de interesse e um sinal de terminação. Tais vetores podem ser obtidos comercialmente, incluindo aqueles fornecidos por Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, Calif.), Stratagene (La Jolla, Calif), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), New England Biolabs (Beverly, Mass.) e Promega (Madison, Wis.). Alguns exemplos de vetores utilizados na presente invenção, mas não limitados, são os vetores da série pCambia (BioForge Co.), pBI121 (Chen, Po-Yen; Wang, Chen-Kuen; Soong, Shaw-Ching; To, Kin-Ying. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. . *Molecular Breeding* vol. 11 issue 4 May 2003. p. 287-293), pBSK (Addgene Co.), pGEM-T easy (Promega Corpora-

tion), pET101/ D-TOPO (Invitrogen). A obtenção de vetores recombinantes compreendendo promotores ligados a ácidos nucleicos é conhecida no estado da técnica e pode ser encontrada em Sambrook et al. (Sambrook, J., Russell, D. W., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989).

“Substancialmente similar” ou “similaridade substancial” refere-se a fragmentos de ácidos nucleicos nos quais mudanças em uma ou mais bases de nucleotídeos não afetam a habilidade do fragmento de ácido nucleico mediar a alteração da expressão gênica pelo silenciamento gênico através, por exemplo, da tecnologia antisense, co-supressão ou RNA de interferência (RNAi). Fragmentos de ácido nucleico substancialmente similares da presente invenção podem ser caracterizados também pela porcentagem de similaridade de suas sequências de nucleotídeos com as sequências de nucleotídeo dos fragmentos de ácidos nucleicos descritas aqui (SEQ ID Nº 1, SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 3, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6), como determinada por algoritmos comuns empregados no estado da técnica. Os fragmentos de ácidos nucleicos preferidos são aqueles cujas sequências de nucleotídeos têm pelo menos cerca de 40 ou 45% de identidade de sequência, preferencialmente cerca de 50% ou 55% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 60% ou 65% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 70% ou 75% de identidade de sequência, mais preferencialmente cerca de 80% ou 85% de identidade de sequência, mais preferencialmente ainda com cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência quando comparada com a sequência de referência.

Uma das formas de se formar o dsRNA é estando presente na molécula de DNA a sequência de nucleotídeos do gene alvo na orientação sense, e uma sequência de nucleotídeos na orientação antisense, podendo haver ou não uma região espaçadora entre as sequências de nucleotídeos sense e antisense. As sequências de nucleotídeos mencionadas podem ser constituídas de cerca de 19nt a 2000nt ou ainda cerca de 5000 nucleotídeos ou mais, cada um tendo uma similaridade substancial de sequência total

com cerca de 40% a 100%. Quanto mais longa for a sequência, menos es-
tringência é requerida para similaridade substancial total da sequência. Os
fragmentos contendo pelo menos cerca de 19 nucleotídeos devem ter prefe-
rencialmente cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou
5 99% de identidade de sequência quando comparada com a sequência de
referência, com possibilidade de ter cerca de 2 nucleotídeos distintos não
contíguos. Preferencialmente são utilizados fragmentos acima de 60pb,
mais preferencialmente ainda fragmentos entre 100 a 600pb.

Em um dos aspectos da invenção, a molécula de dsRNA pode
10 compreender uma ou mais regiões tendo uma similaridade substancial de
sequência para as regiões com pelo menos cerca de 19 nucleotídeos con-
secutivos dos nucleotídeos sense do gene alvo, definida como primeira regi-
ão e, uma ou mais regiões tendo uma similaridade substancial de sequência
para as regiões com cerca de 19 nucleotídeos consecutivos do complemen-
15 to dos nucleotídeos sense do gene alvo, definida como segunda região, on-
de essas regiões podem ter pares de bases separando-as uma da outra.

Convenientemente, o dsRNA (RNA de dupla fita) como descrito
pode ser introduzido dentro de células hospedeiras pela introdução e possí-
vel integração de uma construção gênica contendo as moléculas de ácido
20 nucleico da presente invenção, transcrição das mesmas para produção do
dsRNA. Portanto, em uma outra concretização, a invenção é também supor-
tada por possuir uma construção gênica que é capaz de ser expressa em
células de organismos eucariotos de interesse, operacionalmente ligada a
uma molécula de DNA que quando transcrita produz uma molécula de dsR-
25 NA compreendendo uma primeira região e uma segunda região, em que:

(a) a primeira região compreende uma sequência de nucleotídeos
de pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos tendo uma similari-
dade substancial de sequência com pelo menos cerca de 19 nucleotídeos
consecutivos da sequência de nucleotídeos sense do gene alvo;

30 (b) a segunda região compreende uma sequência de nucleotí-
deos de cerca de pelo menos 19 nucleotídeos consecutivos tendo uma simi-
laridade substancial de sequência com o complemento de cerca de pelo

menos 19 nucleotídeos consecutivos da sequência de nucleotídeos sense do gene alvo;

(c) a primeira e a segunda região são capazes de formar uma região de RNA dupla-fita, a qual pode ter, além do comprimento total da primeira e da segunda região, uma região espaçadora entre elas contendo pelo menos cerca de 3 nucleotídeos.

“Promotor” refere-se à sequência de DNA em um gene, usualmente localizada a montante da sequência codificadora, a qual controla a expressão da sequência codificadora promovendo o reconhecimento pela RNA polimerase e outros fatores requeridos para a própria transcrição. Em uma construção de DNA artificial, promotores podem também ser utilizados para transcrever dsRNA. Promotores podem também conter sequências de DNA que estão envolvidas na ligação de fatores de proteínas as quais controlam o efeito do início da transcrição em resposta a condições fisiológicas ou de desenvolvimento.

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

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

“expressão” refere-se a transcrição e acumulação estável do dsRNA derivado dos fragmentos de ácidos nucleicos da invenção que, em conjunto com a aparelhagem de produção de proteína da célula, resulta em níveis alterados de mio-inositol 1-fosfato sintase. “Inibição por interferência” refere-se a produção de transcritos de dsRNA capazes de prevenir a expressão da proteína alvo.

“Sequências regulatórias apropriadas” referem-se a sequências de nucleotídeos em genes nativos ou quiméricos que estão localizadas acima (região 5' não traduzida), dentro, e/ou abaixo (região 3' não traduzida) dos fragmentos de ácido nucleicos da invenção, as quais controlam a expressão dos fragmentos de ácido nucleicos da invenção.

“Níveis alterados” referem-se à produção de produtos gênicos em organismos transgênicos em quantidades ou proporções que diferem daquelas em organismos normais ou não-transgênicos. A presente invenção também relata vetores, os quais incluem sequências do gene das enzimas quitina sintase 1 e 2 na orientação sense e antisense, e células hospedeiras, as quais são geneticamente engenheiradas com vetores da invenção. “Transformação” refere-se a transferência do gene exógeno para dentro do genoma de um organismo hospedeiro e sua herança geneticamente estável.

“Plantas” referem-se a organismos fotossintéticos, ambos eucariotos e procariotos, onde o termo “plantas desenvolvidas” refere-se a plantas eucariotas. Os ácidos nucleicos da invenção podem ser utilizados para conferir tratos desejados em essencialmente qualquer planta. Então, a invenção possui uso sobre várias espécies de plantas, incluindo espécies dos gêneros Anacardium, Anona, Arachis, Artocarpus, Asparagus, Atropa, Avena, Brassica, Carica, Citrus, Citrullus, Capsicum, Carthamus, Cocos, Coffea, Cucumis, Cucurbita, Daucus, Elaeis, Fragaria, Glycine, Gossypium, Helianthus, Heterocallis, Hordeum, Hyoseyamus, Lactuca, Linum, Lolium, Lupinus, Lycopersicon, Malus, Manihot, Majorana, Medicago, Nicotiana, Olea, Oryza, Panicum, Pannesetum, Passiflora, Persea, Phaseolus, Pistachia, Pisum, Pyrus, Prunus, Psidium, Raphanus, Ricinus, Secale, Senecio, Sinapis, Solanum, Sorghum, Theobromus, Trigonella, Triticum, Vicia, Vitis, Vigna, e Zea.

Em um dos aspectos da invenção, o promotor é um promotor expresso em plantas. Como usado aqui, o termo “promotor expresso em plantas” significa uma sequência de DNA que é capaz de iniciar e/ou controlar a transcrição em uma célula de planta. Isso inclui qualquer promotor de origem vegetal; qualquer promotor de origem não vegetal o qual seja capaz de direcionar a expressão em uma célula vegetal, por exemplo promotores de origem viral ou bacteriana tais como CaMV35S (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hapster et al, 1988 Mol. Gen. Genet. 212, 182-190) e promotores do gene presentes no T-DNA de *Agrobacterium*; promotores tecido-específicos ou órgão-específicos, incluindo mas não limitados a promotores semente-específicos (WO8903887), promotores específicos de órgãos primordiais (como mencionado no pedido de patente US20030175783, An et al., 1996 The Plant Cell 8, 15-30), promotores específicos de caule (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1988 EMBO J. 7: 3625-3633), promotores específicos de folhas (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Hudspeth et al., 1989 Plant Mol Biol 12:579-589), promotores específicos de mesófilo, promotores específicos de raiz (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keller et al., 1989 Genes Devel. 3:1639-1646), promotores específicos de tubérculos (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Keil et al., 1989 EMBO J. 8: 1323:1330), promotores específicos de tecidos vasculares (como mencionado no pedido de patente US20030175783, Peleman et al., 1989 Gene 84: 359-369), promotores específicos de estames (WO8910396, WO9213956), promotores específicos da zona de deiscência (WO9713865); e semelhantes.

O sinal de terminação da transcrição e a região de poliadenilação da presente invenção inclui, mas não está limitado a, sinal de terminação de SV40, sinal de adenilação de HSV TK, sinal de terminação do gene da nopalina sintetase de *Agrobacterium tumefaciens* (nos), sinal de terminação do gene RNA 35S do CaMV, sinal de terminação do vírus que ataca o *Trifolium subterranean* (SCSV), sinal de terminação do gene *trpC* de *Aspergillus nidulans*, e outros semelhantes.

A presente invenção também inclui prover moléculas de dsRNA, as quais podem ser obtidas por transcrição das moléculas contidas nas construções gênicas, e que são úteis para os métodos de acordo com a invenção.

5 Um outro objeto da presente invenção é prover células eucariotas, e organismos eucariotas contendo moléculas de dsRNA da invenção, ou contendo os gene quiméricos ou as construções gênicas capazes de produzir moléculas de dsRNA da invenção. As construções gênicas podem estar estavelmente integradas no genoma das células de organismos euca-
10 riotas.

Em outro aspecto da invenção, as construções gênicas podem estar providas em uma molécula de DNA capaz de se replicar de forma autônoma nas células de organismos eucariotas, tais como vetores virais. A construção gênica ou o dsRNA pode também estar disposto de forma tran-
15 siente nas células de organismos eucariotas.

As construções gênicas ou gene quimérico da invenção podem ser introduzidas dentro do genoma da planta hospedeira desejada através de uma variedade de técnicas convencionais. Por exemplo, pode ser introduzido diretamente dentro do DNA genômico da célula vegetal utilizando
20 técnicas tais como eletroporação e microinjeção de protoplastos de células de plantas, ou a construção pode ser introduzida diretamente no tecido vegetal utilizando-se métodos balísticos, tais como bombardeamento de partículas recobertas com DNA.

Técnicas de microinjeção são conhecidas no estado da técnica e
25 bem descritas em literatura científica e patentária. A introdução de construções gênicas utilizando-se precipitações de polietileno glicol é descrita em Paszkowski et al. Embo J. 3:2717-2722, 1984 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). Técnicas de eletroporação são descritas em From et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824, 1985 (como mencionado no
30 pedido de patente US20020152501). Técnicas de transformações balísticas são descritas em Klein et al. Nature 327:70-73, 1987 (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

Alternativamente, as construções gênicas podem ser combinadas com regiões flanqueadoras de T-DNA apropriadas e introduzidas dentro de vetor convencional hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens*. A função de virulência do hospedeiro *Agrobacterium tumefaciens* direcionará a inserção das construções gênicas e marcador adjacente dentro do DNA da célula vegetal quando a célula é infectada pela bactéria. Técnicas de transformação mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluindo desarmamento e o uso de vetores binários, são bem descritas na literatura científica (como mencionado no pedido de patente US 20020152501, Horsch et al. Science 233:496-498, 1984; e Fraley et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803, 1983).

Células de plantas transformadas que são derivadas de qualquer uma das técnicas de transformação descritas acima podem ser cultivadas para regenerar uma planta inteira que possua o genótipo transformado e então o fenótipo desejado tal como ausência ou redução da formação de estruturas quitinosas de insetos coleópteros tais como a cutícula e/ou a membrana peritrófica. Tais técnicas de regeneração contam com a manipulação de certos fitohormônios em meio de crescimento de cultura de tecidos, tipicamente contendo um marcador biocida e/ou herbicida, que deve ser introduzido junto com a sequência de nucleotídeos desejada. Regeneração de plantas a partir de cultura de protoplastos é descrita em Evans et al., Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; e Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501). A regeneração pode ser também obtida através de calos de planta, explantes, órgãos, ou parte da mesma. Tais técnicas de regeneração são descritas geralmente em Klee et al., Ann. Ver. Of Plant Phys. 38:467-486, 1987 1985 (como mencionado no pedido de patente US20020152501).

Sem restringir a invenção para um particular modo de ação, espera-se que a enzima em células eucariotas responsável por gerar pequenas moléculas de RNA com cerca de 21 nucleotídeos de dsRNA (como a DICER

em *Drosophila*) possa ser saturada através da inclusão de um excesso de sequências de dsRNA (isto é, moléculas de RNA complementares) que não estão relacionadas com a sequência de nucleotídeos do gene alvo ou do gene a ser silenciado.

- 5 A variação natural na regulação pós-transcricional da expressão do gene alvo ocorrendo entre diferentes linhagens de organismos eucariotos compreendendo a mesma molécula de dsRNA será substituída através da manipulação do espectro de silenciamento gênico. Esse fato pode ocorrer através da inclusão de sequências de nucleotídeos de dsRNA extras não
- 10 relacionadas com o gene alvo, as quais são operacionalmente ligadas aos dsRNA formados pela primeira e segunda região.

As concretizações da presente invenção podem ser efetivas contra uma variedade de pragas. Para os propósitos da presente invenção, as pragas incluem, mas não estão limitadas a, insetos, fungos, bactérias, nematóides, ácaros, patógenos protozoários, parasitas animais, e semelhantes. Pragas de particular interesse são insetos-praga, particularmente insetos-praga que causam danos significativos para plantas agrícolas. Entende-se como "insetos-praga" insetos e outras pragas similares tais como, por exemplo, os insetos das ordens Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera,

15 Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., particularmente Coleoptera, especialmente *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida. Insetos-praga da presente invenção da maioria das cultivares incluem, mas não estão limitadas a: Milho -

20 *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea grandiosella*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Diatraea saccharalis*, *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica longicornis barberi*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Melanotus* spp., *Cyclocephala borealis*, *Cyclocephala immaculata*, *Popillia japonica*, *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*,

25

30

Rhopalosiphum maidis, *Anuraphis maidiradicis*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus sanguinipes*, *Hylemya platura*, *Agromyza parvicornis*, *Anaphothrips obscurus*, *Solenopsis milesta*, *Tetranychus urticae*; Sorgo - *Chilo partellus*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa*
 5 *zea*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Feltia subterranea*, *Phyllophaga crinita*, *Eleodes*, *Conoderus*, e *Aeolus* spp., *Oulema melanopus*, *Chaetocnema pulicaria*, *Sphenophorus maidis*, *Rhopalosiphum maidis*, *Sipha flava*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Contarinia sorghicola*, *Tetranychus cinnabarinus*, *Tetranychus urticae*; Trigo - *Pseudaletia unipunctata*, *Spodoptera frugiperda*,
 10 *Elasmopalpus lignosellus*, *Agrotis orthogonia*, *Elasmopalpus lignosellus*, *Oulema melanopus*, *Hypera punctata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Schizaphis graminum*, *Macrosiphum avenae*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Melanoplus sanguinipes*, *Mayetiola destructor*, *Sitodiplosis mosellana*, *Meromyza americana*, *Hylemya coarctata*, *Frankliniella*
 15 *fusca*, *Cephus cinctus*, *Aceria tulipae*; Girassol - *Cylindrocapturus adspersus*, *Smicronyx fulus*, *Smicronyx sordidus*, *Suleima helianthana*, *Homoeosoma electellum*, *Zygogramma exclamationis*, *Bothyrus gibbosus*, *Neolasiop-
 tera murtfeldtiana*; Algodão - *Heliothis virescens*, lagarta-das-maçãs; *Helicoverpa*
 20 *zea*, lagarta da espiga do milho; *Spodoptera exigua*, lagarta do cartucho; *Pectinophora gossypiella*, lagarta rosada; *Anthonomus grandis*, bicudo-do-algodoeiro; *Aphis gossypii*, pulgão-do-algodoeiro; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltadora do algodão; *Trialeurodes abutilonea*, mosca branca
Bemisia tabaci; *Melanoplus femurrubrum*, gafanhoto; *Melanoplus differentialis*, gafanhoto; *Thrips tabaci*, tripes-do-fumo; *Frankliniella fusca*, tripes; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro vermelho; *Tetranychus urticae*, ácaro-rajado;
 25 Arroz - *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa zea*, *Collaspis brunnea*, *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Sitophilus oryzae*, *Nephotettix nigropictus*, *Blissus leucopterus leucopterus*, *Acrosternum hilare*; Soja - *Pseudoplusia includens*, *Anticarsia gemmatilis*, *Plathypena scabra*, *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa*
 30 *zea*, *Epilachna varivestis*, *Myzus persicae*, *Empoasca fabae*, *Acrosternum hilare*, *Melanoplus femurrubrum*, *Melanoplus differentialis*, *Hylemya platura*,

Sericothrips variabilis, *Thrips tabaci*, *Tetranychus turkestanii*, *Tetranychus urticae*; Cevada - *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Schizaphis graminum*, *Blissus leucopterus leucopterus*; *Acrosternum hilare*, *Euschistus servus*, *Jylemya platura*, *Mayetiola destructor*, *Petrobia latens*; Canola - *Vrevicoryne brassicae*, *Phyllotreta cruciferae*, *Phyllotreta striolata*, *Phyllotreta nemorum*, *Meligethes aeneus*, *Meligethes rufimanus*, *Meligethes nigrescens*, *Meligethes canadensis*, e *Meligethes viridescens*; Batata - *Leptinotarsa decemlineata*.

EXEMPLOS

10 A presente invenção é ainda definida nos seguintes Exemplos. Deve ser entendido que esses Exemplos, enquanto indicam parte da invenção, são colocados como forma de ilustração somente, não tendo, portanto, qualquer cunho limitante do escopo das presentes invenções.

Técnicas usuais de biologia molecular tais como transformação
15 de bactérias e eletroforese em gel de agarose de ácidos nucleicos são referidos através de termos comuns para descrevê-los. Detalhes da prática dessas técnicas, bem conhecidos no estado da técnica, são descritos em Sambrook, et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). Várias soluções utilizadas nas manipula-
20 ções experimentais são referidas por seus nomes comuns tais como “solução de lise”, “SSC”, “SDS”, etc. As composições dessas soluções podem ser encontradas na referência Sambrook, et al. (supracitada).

Exemplo 1 – Identificação de sequência de nucleotídeos das enzimas Quitina sintase 1 e Quitina sintase 2 de *Anthonomus grandis* para
25 preparo do dsRNA.

Ovos, larvas e insetos adultos de *A. grandis* foram obtidos do Laboratório de bioecologia e semioquímicos de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF. A colônia foi alimentada com dieta artificial como descrito por Monnerat et al (MONNERAT, R. G., et al.,
30 Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. Comunicado Técnico, 46, Embrapa-Cenargen: Brasília, 2000) e mantida a 26 ± 2 °C, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Para a clonagem e sequenciamento de quitina sintase 1 e quitina sintase 2 de *A. grandis* o RNA total foi isolado de ovos, larvas e insetos adultos utilizando Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 5 µg de RNA total utilizando o kit
5 Superscript II TM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) utilizando oligo NV-d(T)30-AP (Tabela I). Para a amplificação inicial de segmentos de Quitina sintase 1 e Quitina sintase 2 de *A. grandis* foram utilizados iniciadores degenerados correspondendo a regiões conservadas encontradas em domínios catalíticos de Quitinas sintases de outros insetos. Foram realizadas duas etapas consecutivas de PCR utilizando iniciadores de-
10 generados. A primeira etapa de PCR consistiu na amplificação do segmento no domínio catalítico entre os aminoácidos conservados DPDYYEFE e LHPQE, utilizando oligonucleotídeos degenerados para o oligonucleotídeo iniciador senso e para o iniciador antisenso. As condições de PCR nesta
15 primeira etapa foram as seguintes: 1 µL de cDNA diluído (1:20), 2,0 µL de tampão 10X High Fidelity, 0,8 µL de MgSO₄ (50mM), 0,4 µL de dNTP (10 mM), 0,4 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 0,2 µL (1U) de Taq Platinum® High Fidelity (Invitrogen) e 14,8 µL de H₂O. Na segunda etapa foi utilizado como molde o produto da primeira etapa diluído 1:20 e foram utiliza-
20 dos oligonucleotídeos iniciadores entre as regiões DGDIDF (iniciador senso) e QYDQGEDRW ou GPGTIFLM (iniciador antisenso). Nas duas etapas as reações de PCR com os iniciadores degenerados foram realizadas utilizando as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 mi-
25 nuto.

Para obter a sequência completa de cDNA de quitinas sintases, as extremidades 5' e 3' foram amplificadas utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados a partir da região conservada sequenciada previamente. A Figura 1 ilustra as etapas da clonagem do cDNA de AntgCHS1 sintetizado a partir do RNA extraído de ovos de *A. grandis*. Os oligonucleotí-
30 deos utilizados nas etapas da clonagem e AntgCHS1 estão listados na Tabela I. Já a figura 2 ilustra as etapas da clonagem do cDNA de AntgCHS2

sintetizado a partir do RNA extraído de larvas e adultos de *A. grandis*. Os oligonucleotídeos utilizados nas etapas da clonagem de AntgCHS2 estão listados na Tabela II. A sequência completa do cDNA de AntgCHS1 SEQ ID Nº 1 e do cDNA de AntgCHS2 SEQ ID Nº 3 foram obtidas pela sobreposição dos fragmentos obtidos pelo 5' e 3' RACE.

Tabela I - Lista de oligonucleotídeos utilizados na clonagem de AntgCHS1

Nome do oligo-nucleotídeo	Nº do frag-mento (figura 1)	Tama-nho (pb)	Oligonucleotídeo		
			Dire-ção	Tipo	Sequência (5'-3')
NV-d(T)30-AP	1	1268	A	D	GAATTCACGCGTCGACTAG-TAGCATATGTAC(T) ₃₀ VN
QuiSyntFor2010-DPD			S	D	GAYCCNGAYTAYTAYGAR-TTYGAR
QuiSyntRev3270-LHP			A	D	YTCYTGNGGRTGNA
QuiSyntFor2400-DGD		S	D	GAYGGNGAYATYGAYTTY	
QuiSyntRev2960-GPG	2	588	A	D	CATVAGGAADATVG-TDCCGGGDCCMAR
5'CHS1fw			S	E	TTAATCGTTGTGGATATTTAA-TAG
Antg-CHS1conservado rv		A	E	GAAAAACATCCGGGACTACA-CAGTACGCA	
Antg-CHS1conservado fw	3	2675	S	E	CGGGGATATTGATTTC CAACC
AgQS1GTWc122 19rv			A	E	TGACTTACACCAACTTATCC

Tabela II - Lista de oligonucleotídeos utilizados na clonagem de AntgCHS2

Nome do oligonucleotídeo	Nº do fragmento (figura 2)	Tamanho (pb)	Oligonucleotídeo		
			Direção	Tipo	Sequência (5'-3')
NV-d(T)30-AP	1	1268	A	D	GAATTCACGCGTCGACTAG-TAGCATATGTAC(T) ₃₀ VN
QuiSyntFor2010-DPD			S	D	GAYCCNGAYTAYTAYGAR-TTYGAR
QuiSyntRev3270-LHP			A	D	YTCYTGNGGRTGNA
QuiSyntFor2400-DGD		324	S	D	GAYGGNGAYATYGAYTTY
QuiSyntRev2700-			A	D	CCANCKRTCYTC-

QYD			NCCYTGRTCRTAYTG		
5'-1AntgCHS2fw	2	2601	S	E	CAAATTTCTCAAAAATCG- CCACC
Antg- CHS2conservadorv			A	E	AACATGAGAAATATCGTTCC
5'-2AntgCHS2fw	3	731	S	E	GGGATTTTGAAATCATACTT- GGTA
AntgCHS2-c8194- Rv			A	E	GCGAGCATCAAAAACCATA- TCC
AgQSconservadofw	4	2450	S	E	CGGGGATATTGATTT- CCAACC
GTW-AP			A	E	TCCGAATTCACGCGTCGAC- TAGTAGCA

O desenho do segmento de RNA dupla fita consistiu na escolha de fragmentos entre 180 pb e 600 pb, (SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6) utilizando como molde as sequências do cDNA Antg-CHS1 e AntgCHS2. Para o desenho de RNA dupla fita foi utilizado o programa BLOCK-iT™ RNAi Designer (disponível em <http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>), que analisa as sequências e indica regiões de maior probabilidade para uso em silenciamento gênico.

Os moldes de DNA para a síntese do RNA dupla fita (dsRNA), por transcrição *in vitro*, foram sintetizados por PCR, as sequências dos oligonucleotídeos estão listadas na tabela III. As regiões-alvos selecionadas do cDNA foram amplificadas através de reações de PCR utilizando iniciadores específicos flanqueados pela sequência mínima do promotor T7 (5'- TAA-TACGACTCACTATAGGGAGA) utilizando as seguintes condições: 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Após amplificação, os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM-T-easy para confirmação da sequência alvo por sequenciamento. Os produtos de PCR das sequências alvos obtidos e sequenciados sem as regiões da sequência do promotor T7 estão descritas nas sequências SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6. O detalhamento das sequências SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6 estão descritas no exemplo 4.

Tabela III - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para

a síntese dos moldes para a transcrição *in vitro* de dsRNA

Nome do oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo (5'-3')	Identificação do amplicom (pb)
AntgCHS1-dsRNAfw	TAATACGACTCACTATAGGGAGAATCA-CAGGAGCAGCGTTGC	SEQ ID Nº 2
AntgCHS1-dsRNArv	TAATACGACTCACTATAGGGAGAACAC-CAACTTATCCAATATC	
AntgCHS2.1-dsRNAfw	TAATACGACTCACTATAGGGAGATCAAA-TTTCTCAAAATCG	SEQ ID Nº 4
AntgCHS2.1-dsRNArv	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGAG-CATCAAAAACCATATC	
AntgCHS2.2-dsRNAfw	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGGA-GACATCGATTTC AAC	SEQ ID Nº 5
AntgCHS2.2-dsRNArv	TAATACGACTCACTATAGGGA-GAAACATGAGAAATATCGTTCC	
AntgCHS2.3-dsRNAfw	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGTA-GACGCTCACGTATCC	SEQ ID Nº 6
AntgCHS2.3-dsRNArv	TAATACGACTCACTATAGGGA-GATCTTCTGTGAATTGCTGCC	
GusEC-dsRNAfw	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAC-TGAAGTGGCAGACTATC	Controle negativo
GusEC-dsRNArv	TAATACGACTCACTATAGGGAGAG-CGGGTAGATATCACACTCTGT	

Após a confirmação da sequência molde a síntese de dsRNA foi realizada utilizando 0,5 µg do produto de PCR das sequências SEQ ID Nº 2, SEQ ID Nº 4, SEQ ID Nº 5 e SEQ ID Nº 6, flanqueadas com a região promotora da RNA polimerase do T7, como molde para um volume de reação de transcrição de 20 µL, conforme descrito no protocolo do manual do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion), a reação continha 7,5mM de cada ribonucleotídeo ATP, CTP, GTP e UTP, tampão 1x e 50U de T7 RNA polimerase.

A reação foi incubada por 16 hs a 37°C, seguido por tratamento com DNase I por 15 minutos. Para alinhamento do RNA fita dupla, os produtos da reação foram incubados a 70°C por 5 minutos e resfriados em temperatura ambiente (22°C). Para purificação dos produtos da transcrição se-

guiu-se uma extração com fenol/clorofórmio e subsequente precipitação com álcool isopropílico, conforme protocolo descrito pelo fabricante do kit MEGAscript® T7 High Yield (Ambion). O dsRNA foi dissolvido em água tratada com DEPC. A integridade do dsRNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e a quantificação foi obtida por espectrofotometria. A concentração final de cada dsRNA foi ajustada para 200 ng/μL para ser utilizados nos ensaios de microinjeção para avaliação do silenciamento gênico.

Exemplo 2 – Bioensaios de microinjeção de dsRNA em *Anthonomus grandis*

Amostras quantificadas de RNA dupla fita (dsRNA) foram utilizadas em bioensaios contra o bicudo do algodoeiro. O dsRNA foi preparado a partir de sequências identificadas conforme descrito no exemplo 1. Para o procedimento de microinjeção em *A. grandis* insetos adultos e larvas foram previamente anestesiados em gelo por 10 minutos. A microinjeção foi realizada utilizando uma seringa Hamilton de 10 μL, em cada inseto foi aplicado 1 μL de solução aquosa contendo ou não o dsRNA. A injeção na larva foi realizada na região dorsal entre o quarto ou quinto segmento abdominal. Nos insetos adultos houve necessidade de levantar um dos élitros para expor o abdômen, local da microinjeção. Depois da injeção os insetos foram:

- 1) mantidos em condições padrões de alimentação em dieta artificial como descrito por Monnerat et al (MONNERAT, R. G., et al., Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. Comunicado Técnico, 46, Embrapa-Cenargen: Brasília, 2000),
- 2) retirados quando necessário de acordo com o período experimental,
- 3) congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C até o momento da extração do RNA total.

Exemplo 3 – Bioensaios de microinjeção de dsRNA em *Anthonomus grandis* para análise funcional de AntgCHS1

A avaliação do silenciamento de AntgCHS1 sobre parâmetros fenotípicos de fêmeas de *A. grandis* foi determinado por meio de bioensaios de microinjeção de dsRNA AntgCHS1 (SEQ ID Nº 2) em fêmeas adultas. Os parâmetros fenotípicos quantificados foram oviposição, viabilidade de ovos e mortalidade dos insetos adultos. Cada unidade experimental consistiu em 16

insetos fêmeas adultas com 48hs de idade microinjetadas com 200ng de dsRNA e 8 insetos machos adultos não microinjetados, o período experimental foi de 12 dias. Os insetos foram mantidos em pequenas gaiolas, onde o piso da gaiola foi confeccionado com tela para permitir a coleta de ovos. Os insetos machos foram marcados com gliter prateado para facilitar a identificação. O monitoramento do bioensaio foi realizado a cada 48hs, momento no qual eram ofertadas água e dieta artificial *ad libitum*. O bioensaio consistiu em três réplicas biológicas com três réplicas técnicas. O tratamento controle consistiu na aplicação de dsRNA de um gene não relacionado, no caso, foi utilizado dsRNA com sequencia do gene gus de *Escherichia coli*. Para analisar os dados obtidos nos bioensaios foi aplicada uma análise de variância, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância. Os ovos obtidos desse experimento foram submetidos a análise da expressão de AntgCHS1 por PCR em tempo real como descrito no exemplo 5.

Para avaliar o efeito silenciamento AntgCHS1 sobre a formação de larvas neonatas, ovos obtidos do experimento de silenciamento descrito anteriormente foram perfurados mecanicamente com um pinça entomológica para romper a casca do ovo e permitir a eclosão das larvas. As larvas foram mantidas em dieta artificial por sete dias. Após esse período as larvas foram contadas e os fenótipos foram analisados. Os ovos do tratamento controle (dsRNA GUS) também foram submetidos ao mesmo processo de perfuração da sua casca.

Para analisar a função biológica de AntgCHS1 durante o desenvolvimento de pupas de *A. grandis*, larvas de 3° instar foram microinjetadas com 200ng de dsRNA AntgCHS1. Cada unidade experimental consistiu em 20 larvas. O bioensaio consistiu em três réplicas biológicas com três réplicas técnicas. O período experimental foi de 10 dias. Após esse período as larvas foram contadas e os fenótipos obtidos foram analisados e fotografados.

Exemplo 4 – Bioensaios de microinjeção de dsRNA AntgCHS2 em *Anthonomus grandis* para análise funcional de AntgCHS2

Nos ensaios de microinjeção visando a análise do silenciamento

da enzima Quitina sintase 2 (AntgCHS2) foram avaliadas diversas variáveis como descrito a seguir: 1- influência do tamanho do segmento de dsRNA; 2- localização da sequência de dsRNA alvo dentro da sequência de cDNA de AntgCHS2 (SEQ ID N° 3); 3- efeito da concentração de dsRNA microinjetado; 4- persistência do silenciamento durante as fases de desenvolvimento do inseto. Os detalhes destes experimentos são descritos a seguir.

1-Localização da sequência alvo dentro da sequência de cDNA de AntgCHS2 e do tamanho do segmento de dsRNA para o silenciamento:

Para avaliar o efeito da posição da sequência alvo dentro da sequência do cDNA de AntgCHS2 para o silenciamento foram selecionadas três regiões para síntese do dsRNA: o dsRNA localizado na extremidade 5', denominado AntgCHS2-1 (SEQ ID N° 4), compreendendo a região entre os nucleotídeos 425-638 do cDNA de AntgCHS2; o dsRNA localizado na região central, denominado AntgCHS2-2 (SEQ ID N° 5), compreendendo a região entre os nucleotídeos 2379-2966 do cDNA; e o dsRNA localizado na extremidade 3', denominado AntgCHS2-3 (SEQ ID N° 6), compreendendo a região entre os nucleotídeos 4373-4557 do cDNA. Os segmentos escolhidos para a síntese dos dsRNAs tinham os tamanhos de 213, 587 e 184 pares de bases, respectivamente.

Neste ensaio foram microinjetados 200 ng de dsRNA por inseto adulto, no total de 12 insetos. Após 72 hs quatro insetos foram selecionados aleatoriamente, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C. A síntese dos cDNAs dos diferentes tratamentos, bem como a análise por qRT-PCR foram realizados conforme descrito no exemplo 5. Foram realizados dois tratamentos controles, um controle consistiu da aplicação de água tratada com DEPC e o outro controle consistiu da microinjeção de dsRNA GUS.

2-Efeito da dose de dsRNA microinjetado

Para avaliar o efeito da concentração de dsRNA microinjetado sobre o silenciamento de AntgCHS2 foram testadas as concentrações de 50, 100 e 200 ng de dsRNA AntCHSB-3/inseto (SEQ ID N° 6). Este dsRNA foi escolhido dentre os três disponíveis por ser específico para *A. grandis*, e

ter o menor tamanho (184 pb), o que diminui a possibilidade do efeito de silenciamento cruzado com genes não alvos. Neste ensaio, foi microinjetado um total de 12 insetos adultos. Após 72 hs quatro insetos foram selecionados aleatoriamente, congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80 °C. A síntese dos cDNAs dos diferentes tratamentos, bem como a análise por qRT-PCR foram realizados conforme descrito no exemplo 5.

3- Persistência do silenciamento durante as fases de desenvolvimento do inseto

Larvas foram microinjetadas com dsRNA a fim de avaliar a persistência do efeito do RNAi em inseto adulto. Aqui adotaremos a nomenclatura, laRNAi (RNAi larval), sugerida por Huvenne e Smagghe para esse tipo de experimento (HUVENNE, H., et al., Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. Journal of Insect Physiology, v. 56, n. 3. p. 227-235. 2010). As larvas de terceiro instar de desenvolvimento foram microinjetadas com 200 ng de dsRNA AntgCHS2-3 (SEQ ID Nº 6) e colocadas em dieta artificial. Insetos adultos com idade de 72 horas foram submetidos às análises por PCR em tempo Real, conforme descrito no exemplo 5.

A avaliação do silenciamento de AntgCHS2 sobre parâmetros fenotípicos de fêmeas de *A. grandis* foi realizada por meio de bioensaios de microinjeção em fêmeas adultas. Os parâmetros fenotípicos quantificados foram oviposição, viabilidade de ovos e mortalidade dos insetos adultos. Cada unidade experimental consistiu em 16 insetos fêmeas adultas com 48hs de idade microinjetadas com 200ng de dsRNA e 8 insetos machos adultos não microinjetados, o período experimental foi de 12 dias. Os insetos foram mantidos em pequenas gaiolas, onde o piso da gaiola foi confeccionado com tela para permitir a coleta de ovos. Os insetos machos foram marcados com gliter prateado para facilitar a identificação. O monitoramento do bioensaio foi realizado a cada 48hs, momento no qual eram ofertadas água e dieta artificial ad libitum. O bioensaio consistiu em três réplicas biológicas com três réplicas técnicas. O tratamento controle consistiu na aplicação de dsRNA de um gene não relacionado, no caso, foi utilizado dsRNA

com sequencia do gene *gus* de *E. coli*. Para analisar os dados obtidos nos bioensaios foi aplicada uma análise de variância, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de 5% de significância.

Exemplo 5 - Determinação dos níveis de expressão de Antg-CHS1 e AntgCHS2

Para avaliar o efeito do dsRNA sobre a expressão do transcrito alvo (AntgCHS1 e AntgCHS2) foi utilizada a técnica de qRT-PCR (PCR quantitativa em tempo real) (KUBISTA, M., et al., The real-time polymerase chain reaction. Molecular aspects of medicine, v. 27, n. 2-3. p. 95-125. 2006). O RNA total de insetos provenientes de cada tratamento foi isolado utilizando Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) a partir de 1 µg de RNA total tratado com Ambion® DNase I RNase-free™ (Invitrogen) utilizando o oligonucleotídeo NV-d(T)30-AP (ver Tabela I).

A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando SYBR™ Green, como fluoróforo intercalante. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a avaliação dos transcritos são descritos na Tabela IV. Cada reação foi realizada com 2 µL de uma diluição 1:20 de cDNA, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo em um volume total de 10 µL. O programa para qRT-PCR consistiu em um passo inicial a 95°C por 10 minutos seguidos por 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Para a análise das amplificações, a Ct (do inglês - cycle of the threshold) e a eficiência de amplificação de cada oligonucleotídeo (variando de 90% a 100%) foram determinadas pelo programa Real-time PCR Miner (<http://www.miner.ewindup.info/>) (ZHAO, S., et al., Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. Journal of Computational Biology, v. 12, n. 8. p. 1047-1064. 2005). A análise da expressão relativa baseada nos valores de Cts e utilizando múltiplos genes foi realizada no programa qBasePlus versão 2.0 pelo método de Pfaffl (PFAFFL, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nu-

cleic Acids Research, v. 29, n. 9. p. e45. 2001). Todos os experimentos de qRT-PCR foram realizados em duas réplicas biológicas e três repetições técnicas. Os genes *GAPDH* e *beta-Actina* foram utilizados como genes de referência. A análise estatística foi realizada pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05% para comparação entre os tratamentos.

Tabela IV-Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real para análise da expressão de AntgCHS1 e AntgCHS2

Nome do oligonucleotídeo	Sequência do oligonucleotídeo senso (5'-3')	Sequência oligonucleotídeo antisenso (5'-3')	Tamanho do amplícom (pb)	Eficiência (%)
AntgCHS1-RT	TGCTCCTGATA-GATTTGATG	ATCCGGGACTA-CACAGTACGCA	174	105
AntgCHS2-RT	AAGGCAT-TAACGGTGA-CGAC	TCCAAGTCG-TTGATGACTGC	120	101
GAPDH-RT	AGATCG-TCGAGGG-TCTGATG	AAGGCGGGAA-TGACTTTACC	166	99
B-Actina-RT	CCTTTAACAC-CCCTGCTATG	TGAGGTAGTCGG-TCAAGTCA	192	102

Exemplo 6 – Resultados dos bioensaios de microinjeção de dsRNA e avaliação do silenciamento do gene para enzima Quitina sintase 1 em *A. Grandis* (AntgCHS1)

Foi identificada a sequência de cDNA do gene da Quitina sintase 1 (ou A) de *A. grandis*, cujo tamanho foi de 4831 nucleotídeos (SEQ ID NO 1). Dentro desta sequência foi selecionada uma região de 249 pb (SEQ ID NO 2) para servir de molde para a síntese da molécula de dsRNA, conforme descrito no exemplo 1.

Foi verificado por meio dos bioensaios de microinjeção que o dsRNA AntgCHS1 (SEQ ID NO 2) foi capaz de suprimir o número de transcritos da Quitina sintase 1 em ovos de *A. grandis* (Figura 3). Em ensaios de microinjeção do dsRNA AntgCHS1 em adultos de *A. grandis* causou redução da viabilidade dos ovos (Figura 4). Foi observado que as larvas se formaram dentro dos ovos e se movimentavam ativamente, mas não conseguiram

ram eclodir (Figura 4). Alguns desses ovos inviáveis foram perfurados mecanicamente com o auxílio de uma pinça para forçar a eclosão das larvas. Os ovos perfurados foram colocados em dieta artificial para o desenvolvimento das larvas. As larvas provenientes do tratamento com dsRNA AntgCHS1 apresentaram má formações na cápsula cefálica e das mandíbulas e foi observado mortalidade total das larvas eclodidas do tratamento com dsRNA AntgCHS1 (Figura 5).

Em experimentos de microinjeção de dsRNA AntgCHS1 (SEQ ID NO 2) em larvas de último instar foi observado que os todos os insetos silenciados não conseguiram se desenvolver em pupa e morreram. Insetos não silenciados desenvolveram-se normalmente e transformaram-se em adultos (Figura 6).

Exemplo 7 – Resultados dos bioensaios de microinjeção de dsRNA e avaliação funcional do silenciamento do gene para enzima Quitina sintase 2 (AntgCHS2) em *A. grandis*.

Foi identificada a sequência de cDNA do gene da Quitina sintase 2 (ou B) de *Anthonomus grandis*, cujo tamanho foi de 4729 nucleotídeos (SEQ ID NO 3). Dentro desta sequência foram selecionadas três regiões de diferentes tamanhos (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 E SEQ ID NO 6) para servir de molde para a síntese de moléculas de dsRNA, conforme descrito no exemplo 1. Foi verificado por meio dos bioensaios de microinjeção e pelos resultados das análises de PCR em tempo real que dsRNAs de diferentes tamanhos, variando entre 180 pb e 600 pb, foram capazes de suprimir o número de transcritos de AntgCHS2 sem diferirem estatisticamente entre os tratamentos. Do mesmo modo não houve diferença entre as regiões escolhidas como alvo para ao silenciamento, quer seja na extremidade 5', na região central, ou ainda, na extremidade 3' do cDNA (Figura 7). Também por análises de PCR em tempo real foi observado que em insetos adultos microinjeções de 50 ng de dsRNA foram suficientes para após 72 horas, causar redução drástica do número de transcritos (Figura 8). Para os experimento de microinjeção em larvas, o tratamento que apresentou maior efeito foi a microinjeção de 200 ng de dsRNA por inseto (Figura 9). Foi verificado que o

efeito do silenciamento gênico persiste após a metamorfose, ou seja, adultos provenientes de larvas microinjetadas apresentaram redução do número de transcritos da quitina sintase 2 em relação ao tratamento controle (dsRNA GUS) (Figura 10).

- 5 Na avaliação de parâmetros fenotípicos causados pela microinjeção do dsRNA AntgCHS2 (SEQ ID NO 6) verificou-se que após 144 horas as fêmeas microinjetadas com RNAi interromperam a oviposição, causando uma redução de 93% do número de ovos (Figura 11). Além disso, a taxa de mortalidade dos insetos aumentou ao longo do tempo atingindo 100% após
- 10 240 horas. Foi atribuída a esse fenótipo letal, a interrupção inicial da alimentação que resultou, na interrupção da oviposição, seguido da morte do inseto. (Figura 12).

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico isolada caracterizada por ser selecionado do grupo consistindo de:

5 a. Molécula de ácido nucleico isolada compreendendo uma sequência de ácido nucleico substancialmente similar às sequências selecionadas do grupo de SEQ ID No 1, SEQ ID No2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5 e SEQ ID No 6;

10 b. Molécula de ácido nucleico isolada que hibridiza com uma sequência de ácidos nucleicos indicada pelas sequências selecionadas do grupo de SEQ ID No 1, SEQ ID No2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5 e SEQ ID No 6, sob condições de lavagem de 5X SSC, formamida a 50% e 42°C; por 10min;

15 c. Fragmento de pelo menos 19 nucleotídeos contíguos de uma sequência de ácidos nucleicos selecionada selecionadas do grupo de SEQ ID No 1, SEQ ID No2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5 e SEQ ID No 6, onde a ingestão, por coleópteros-praga de plantas, da sequência de um ribonucleotídeo de filamento duplo, compreendendo pelo menos um filamento complementar do referido fragmento, inibe ou reduz a proliferação da referida praga; e

20 d. Complemento da sequência de (a), (b) ou (c).

2. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser selecionada do grupo de SEQ ID No 1, SEQ ID No2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5 e SEQ ID No 6.

3. Gene quimérico caracterizado por compreender:

25 a) um polinucleotídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2; e

b) um promotor ativo, operacionalmente ligado ao polinucleotídeo definido em (a).

30 4. Construção gênica caracterizada por compreender um ou mais genes quiméricos de acordo com a reivindicação 3.

5. Construção gênica caracterizada por compreender:

(a) uma primeira região compreendendo uma sequência de nucle-

otídeos de pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos tendo uma similaridade substancial de sequência com pelo menos cerca de 19 nucleotídeos consecutivos da sequência de nucleotídeos sense conforme descrita em SEQ ID No 1, SEQ ID No2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5 e
5 SEQ ID No 6;

(b) uma segunda região compreendendo uma sequência de nucleotídeos de cerca de pelo menos 19 nucleotídeos consecutivos tendo uma similaridade substancial de sequência com o complemento de cerca de pelo menos 19 nucleotídeos consecutivos da sequência de nucleotídeos sense
10 conforme descrita em SEQ ID No 1, SEQ ID No2, SEQ ID No 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No 5 e SEQ ID No 6.

6. Construção gênica de acordo com a reivindicação 5 caracterizada pelo fato da primeira e a segunda região serem capazes de formar uma região de RNA dupla-fita, a qual pode ter, além do comprimento total
15 da primeira e da segunda região, uma região espaçadora entre elas contendo pelo menos cerca de 3 nucleotídeos.

7. Construção gênica de acordo com a reivindicação 6 caracterizada pelo fato da sequência espaçadora ser um íntron.

8. Vetor caracterizado por compreender a molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1.
20

9. Vetor de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de o referido vetor ser capaz de promover a expressão da molécula de interesse ou um fragmento desta.

10. Sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo caracterizada por ser produzida a partir da expressão de uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1.
25

11. Sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo de acordo com a reivindicação 10 caracterizada pelo fato da ingestão ou assimilação por coleópteros-praga de plantas, da sequência de um ribonucleotídeo de filamento duplo, compreendendo pelo menos um filamento complementar do
30 referido fragmento, inibe ou reduz a proliferação da referida praga.

12. Célula transformada caracterizada por compreender a molé-

cula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1.

13. Célula de acordo com a reivindicação 12 caracterizada por ser uma célula procariótica.

14. Célula de acordo com a reivindicação 12 caracterizada por ser uma célula eucariótica.

15. Célula de acordo com a reivindicação 12 caracterizada por ser uma célula de vegetal ou bactéria.

16. Planta transformada caracterizada por compreender a molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2.

17. Planta de acordo com a reivindicação 16 caracterizada pelo fato da molécula de ácido nucleico ser expressa em uma célula vegetal, sob a forma de uma sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo, e a ingestão de dieta contendo uma quantidade inibidora, para inseto-praga, da referida sequência do ribonucleotídeo de filamento duplo inibe ou reduz a proliferação da referida praga.

18. Planta de acordo com a reivindicação 17 caracterizada pelo fato do inseto-praga ser selecionado pelo grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* e *Hypothenemus hampei*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida e outros coleópteros.

19. Produto comerciável caracterizado pelo fato de ser produzido a partir de uma planta de acordo com a reivindicação 16 onde o referido produto comerciável compreende uma quantidade detectável da molécula de ácido nucleico conforme definida na reivindicação 1 ou de um ribonucleotídeo expresso a partir da mesma.

20. Método para produzir organismos eucarióticos transgênicos nos quais a expressão de um gene alvo nas células do organismo é reduzida, caracterizado por compreender os estágios de:

I) prover uma molécula de ácido nucleico de acordo com a

reivindicação 1;

II) inserir a molécula obtida em "I" em célula ou células do organismo para produzir uma célula ou células transgênicas; e

III) crescer ou regenerar um organismo eucarioto transgênico da célula ou células transgênicas.

21. Método para controle de infestação de coleópteras caracterizado por compreender o fornecimento, na dieta de um coleóptera-praga, de um agente compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou uma sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo de acordo com a reivindicação 10.

22. Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado pelo fato da célula do organismo eucarioto compreender ainda uma sequência de plonucleotídeo que codifica um agente pesticida.

23. Método de acordo com a reivindicação 22 caracterizado pelo fato do agente pesticida ser selecionado do grupo consistindo de patatina, uma proteína insecticida de *Bacillus thuringiensis*, uma proteína *Xenorhabdus* insecticida, uma proteína *Photorhabdus* insecticida, uma proteína de *Bacillus laterosporous* insecticida, uma proteína de *Bacillus sphaericus* insecticida, enzimas da família de quitinase e uma lignina.

24. Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado pelo fato do coleóptero praga ser selecionado do grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* e *Hypothenemus hampei*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichida e outros coleópteros.

25. Método de acordo com a reivindicação 20 caracterizado pelo fato que o modo de atuação da molécula de ácido nucleico ou da sequência de ribonucleotídeo de filamento duplo, ao ser ingerida ou assimilada pela praga, é o de supressão ou redução da expressão de um gene que execute uma função essencial para sobrevivência do inseto.

26. Método de acordo com a reivindicação 25 caracterizada pelo

fato da função essencial para sobrevivência do inseto ser selecionada do grupo de diferenciação e desenvolvimento da cutícula, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, digestão e assimilação de nutrientes, proteção contra patógenos.

5 27. Método para melhorar o rendimento de plantas cultivadas, sujeitas à infestação por insetos-praga, caracterizado por compreender as etapas de:

 e. Introdução de uma molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 na referida planta;

10 f. Cultivo da planta obtida em "a" de modo a permitir a expressão da referida molécula de ácido nucleico, onde essa expressão inibe ou reduz a proliferação da referida praga.

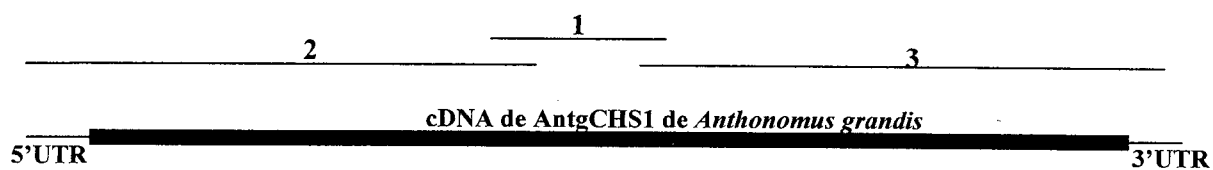
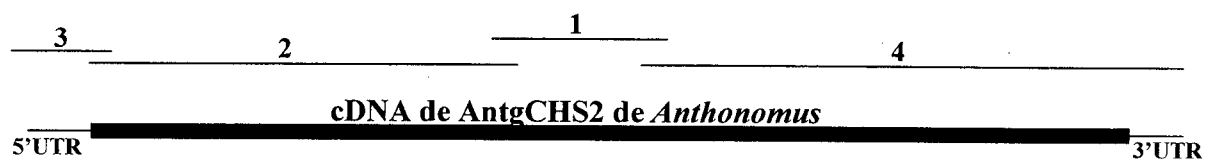
 28. Método de acordo com a reivindicação 27 caracterizado pelo fato da expressão da molécula de ácido nucleico produzir uma molécula de
15 RNA que suprime, pelo mesmo, um primeiro gene alvo em um inseto-praga que ingeriu uma porção da referida planta onde o gene alvo executa, pelo menos uma função essencial para sobrevivência do inseto ser selecionada do grupo de diferenciação e desenvolvimento da cutícula, formação do ovo, maturação larval, transição de estágio larval, pupação, digestão e assimila-
20 ção de nutrientes, proteção contra patógenos.

 29. Método de acordo com a reivindicação 28 caracterizada pelo fato do inseto-praga ser selecionado do grupo consistindo de *Anthonomus grandis*, *Diabrotica virgifera*, *Tenebrio molitor*, *Tribolium castaneum* e *Hypothenemus hampei*, *Phoracantha semipunctata*, *Lixus angustatus*, *Acanthoscelides obtectus* e outros coleópteros que causam danos a madeiras e
25 plantas agronomicamente importantes das famílias Scolytidae, Cerambycidae, Curculionidae e Bostrichidae e outros coleópteros.

 30. Método de produção de um produto comercializável caracterizado pelo fato de compreender a obtenção de uma planta definida de acordo com a reivindicação 16, ou parte da mesma, e o preparo de um produto
30 comercializável a partir da planta ou parte da mesma.

 31. Método de produção de alimento ou ração caracterizado pe-

lo fato de compreender a obtenção de uma planta definida de acordo com a reivindicação 16, ou parte da mesma, e o preparo de alimento ou ração a partir da referida planta ou parte da mesma.

**Fig. 1****Fig. 2**

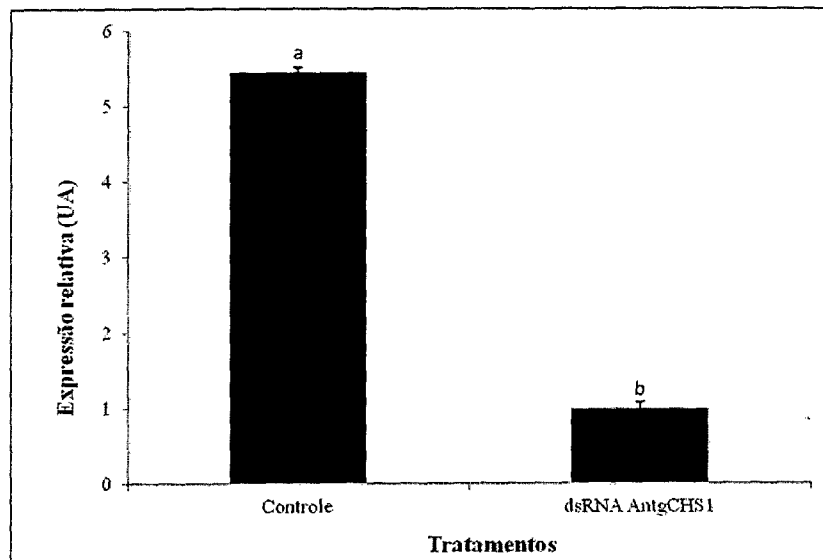


Fig. 3

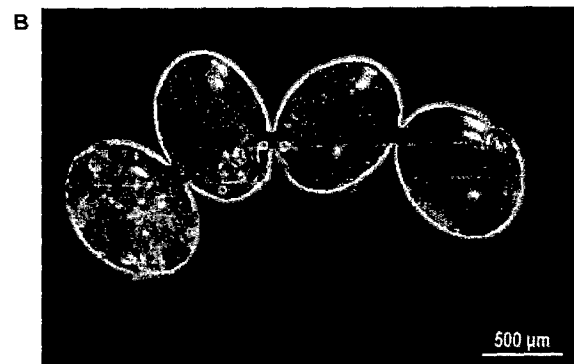
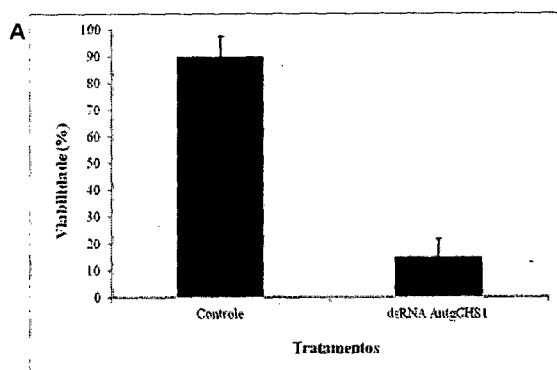


Fig. 4

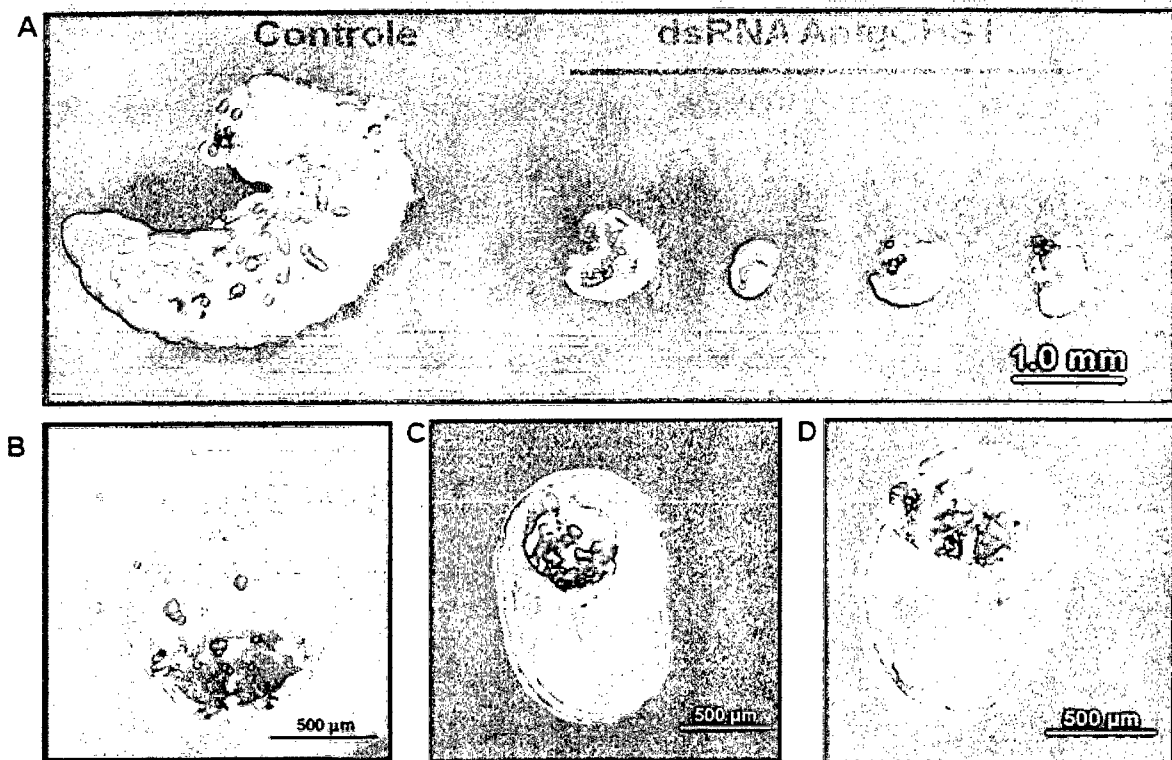


Fig. 5

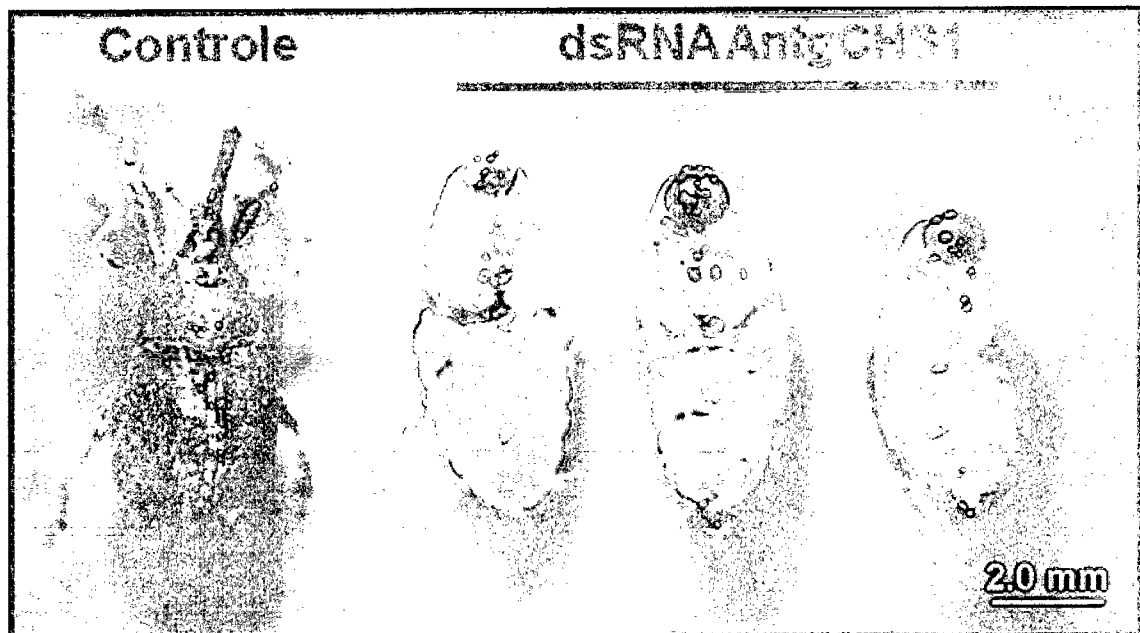


Fig. 6

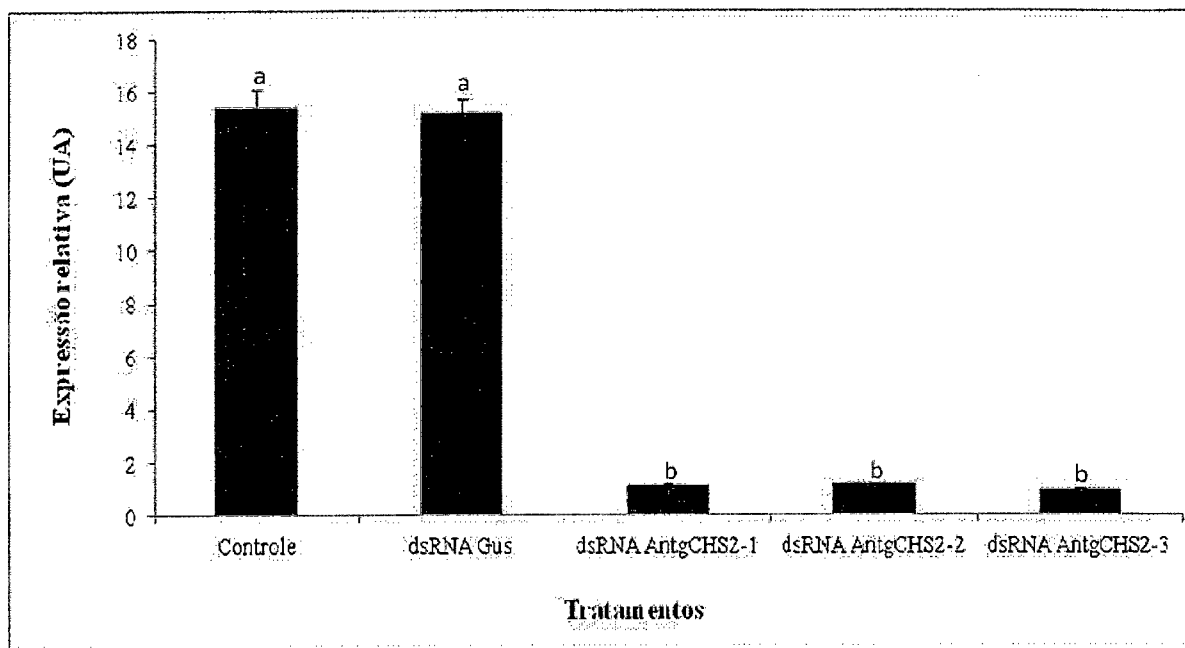


Fig. 7

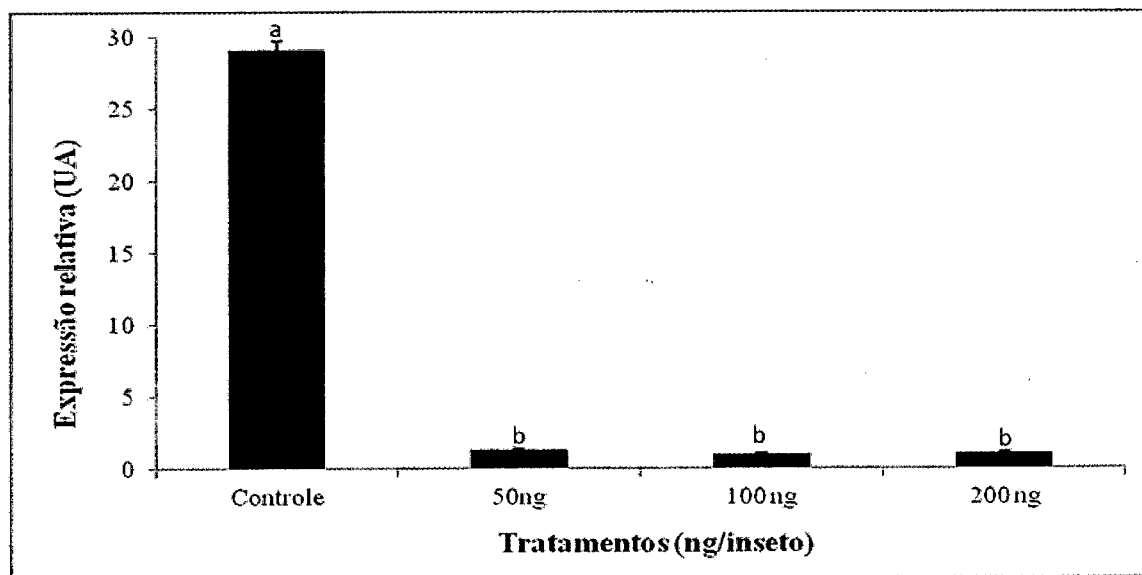


Fig. 8

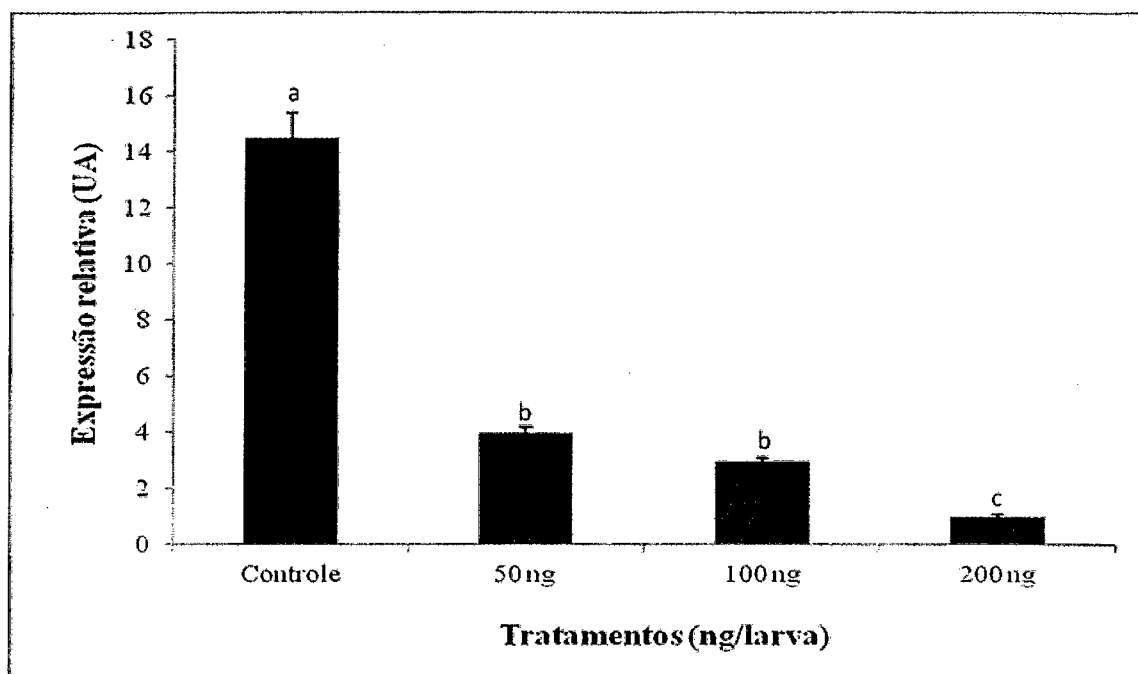


Fig. 9

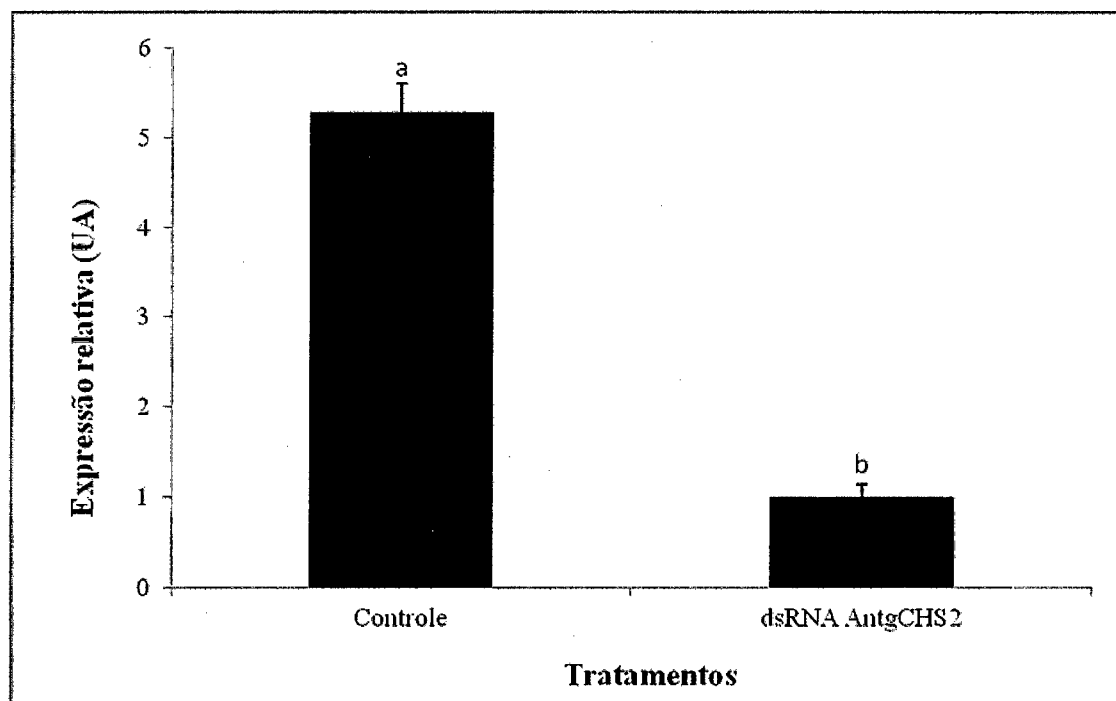


Fig. 10

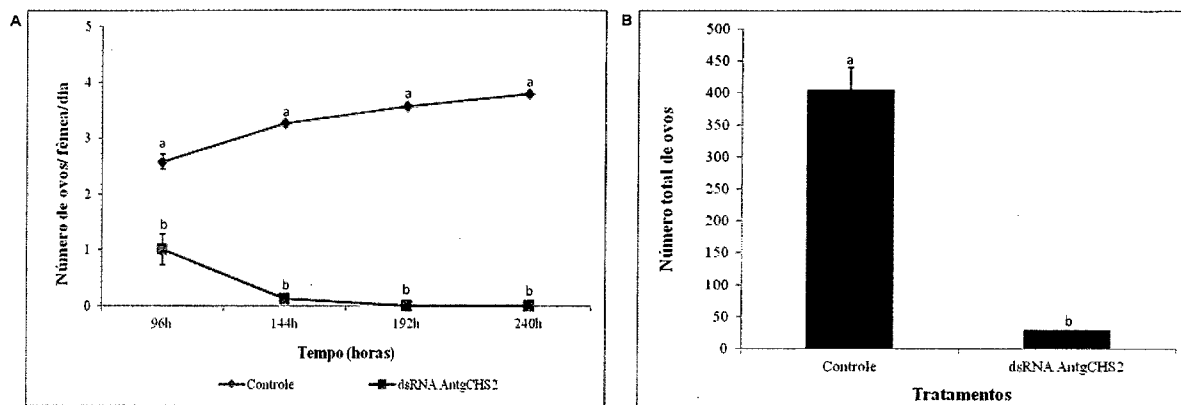


Fig. 11

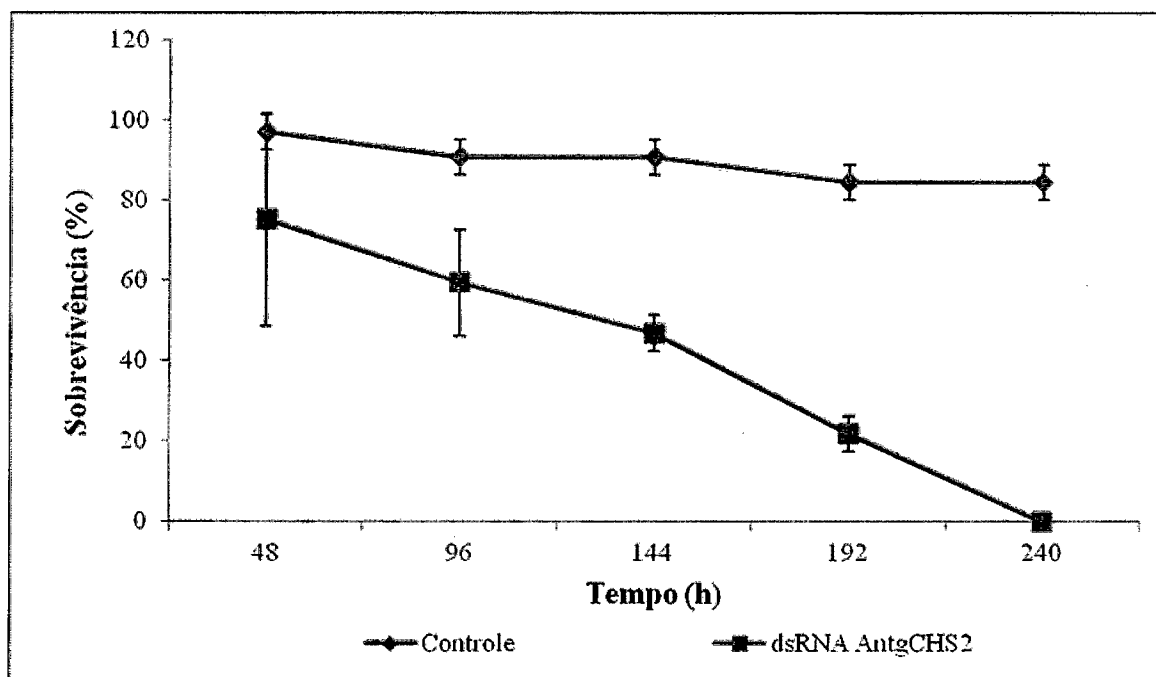


Fig. 12